

Kristiina Dahl

Hermosolujen aktiivisuutta vähentävän reseptorin vaikutus neuroneiden aktiivisuuteen manian hiirimallissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

19.5.2017

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Kristiina Dahl Hermosolujen aktiivisuutta vähentävän reseptorin vaikutus neuroneiden aktiivisuuteen manian hiirimallissa 40 sivua + 4 liitettä 19.5.2017
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketeknologia
Ohjaajat	Tutkijatohtori Teemu Aitta-aho Lehtori Tiina Soininen
<p>Kaksisuuntaista mielialahäiriötä sairastaa noin 60 miljoonaa ihmistä maailmanlaajuisesti. Se on mielenterveyden häiriö, johon kuuluu mania- sekä masennusjaksoja. Manian hoitoon on vaikea löytää yksilöllistä ja tehokasta hoitomuotoa. Kaksisuuntaisen mielialahäiriön ja sen maniavaiheen neuroneiden toimintaa selvittämällä voidaan saada parempi käsitys mielialahäiriöstä ja siihen soveltuvista hoitomuodoista.</p> <p>Tämän insinöörityön tavoitteena oli tutkia hermosolujen aktiivisuutta vähentävän DREADD-reseptorin vaikutusta hippokampuksen neuroneiden aktiivisuuteen GluA1-poistogeenisessä manian hiirimallissa. GluA1-poistogeenistä hiirimallia käytetään mallintamaan kaksisuuntaisen mielialahäiriön maniavaihetta. Työn tarkoituksena oli selvittää hM4Di-reseptorin vaikutusta neuroneiden aktiivisuuteen hippokampuksessa aivoleikkeiden immunohistokemiallisten värjäysten avulla. Tavoitteena oli tutkia neuroneiden aktiivisuutta värjäämällä ja laskemalla aivoleikkeistä cFos-solut ja suorittamalla tilastollinen testi saaduille tuloksille. Lisäksi haluttiin selvittää virusinjektion ja injektion mahdollistaneen ohjauskanyylin sijainti aivokudoksessa aivoleikkeistä sekä DREADD-reseptorin toimivuus ja levinneisyys aivojen eri osa-alueille mCherry-värjäyksen avulla. Tutkimustyö koostui neljästä eri vaiheesta, joita olivat hiirille annettavat virusinjektiot ja aivojen perfuusio, aivoleikkeiden teko, immunohistokemiallisten värjäysten suunnittelu ja toteutus sekä mikroskopia ja kuvankäsittely.</p> <p>Tutkimuksessa havaittiin, että DREADD-reseptorin injektointi oli onnistunut aivoissa halutulle alueelle eikä reseptori ollut levinnyt aivoissa, vaan pysynyt pääosin hippokampuksen alueella. Lisäksi osassa aivoista pystyttiin havaitsemaan ja todentamaan reseptorin aktiivisen toiminta. Tilastollisissa testeissä ei havaittu merkitsevää eroa neuroneiden aktiivisuudessa CNO-lääkekäsittelystä manian hiirimallilla verrattuna kontrolliryhmään. Kuitenkin positiivisten cFos-solujen keskiarvojen perusteella kyseinen reseptori saattoi hieman vähentää hippokampuksen neuroniärsytystä lääkekäsittelystä GluA1-hiirikannalla, jolloin hiirten maaninen käyttäytyminen olisi rauhoittunut. Saadut tulokset auttavat lisäämään ymmärrystä hippokampuksen neuroneiden toiminnasta ja aktiivisuudesta kyseisellä hiirimallilla. Tulokset vaikuttavat lupaavilta, ja tulevaisuudessa on mahdollista löytää lisätutkimusten avulla eri hoitomuotoja ja toimiva lääkitys kaksisuuntaisen mielialahäiriön aiheuttaman manian hoitoon.</p>	
Avainsanat	Mania, DREADD-reseptorit, neuroneiden aktiivisuus, hippokampus, immunohistokemia

Author Title Number of Pages Date	Kristiina Dahl Neuronal silencing receptor's effect on the neuronal activity on a mouse model of bipolar disorder 40 pages + 4 appendices 19 May 2017
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructors	Teemu Aitta-aho, Postdoctoral Researcher Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>Approximately 60 million people suffer from bipolar disorder worldwide. It is a mental disorder which consists of manic and depressive episodes. It is difficult to find individual and effective treatment for mania. By studying bipolar disorder and neuronal activity in manic episodes, a better understanding of this mental disorder and suitable treatments for it could be achieved.</p> <p>The purpose of this thesis was to study neuronal silencing DREADD receptor's effect on the neuronal activity of GluA1 knockout mice. The GluA1 knockout mice are used as a model of bipolar disorder and manic episodes. The aim of this thesis was to study hM4Di receptor's effect on the neuronal activity in the hippocampus by brain sections and immunohistochemistry stainings. One method was to study neuronal activity by staining and counting cFos cells from brain sections and performing a statistical test on the results. In addition, virus injections and injection cannula's location in brains and DREADD receptor's efficiency and distribution to the different brain regions by mCherry staining were studied. This method included four different stages, which were perfusion of the brains, cutting brain sections, planning and executing immunohistochemistry stainings, microscopy and photographing editing.</p> <p>Results show that DREADD-receptor's injection was successful in the target brain region, and the receptor was not spread in the brains but stayed mainly in the hippocampus region. In addition, the receptor's neuronal activity was detected and verified in some of the brains. There was no significant statistical difference in neuronal activity between the CNO drug-treated manic mouse model compared to the control group. However the average of positive cFos cells show that this receptor could decrease the neuronal firing in the hippocampus region of the drug-treated GluA1 knockout mice when their manic behavior decreases. These results increase the understanding of neuronal activity in this mouse model. Results seem promising, and with further research, it is possible to find different treatments and effective drug treatment for the manic episodes caused by the bipolar disorder.</p>	
Keywords	Manic, DREADD receptors, neuronal activity, hippocampus region, immunohistochemistry

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
2.1	Kaksisuuntainen mielialahäiriö	2
2.2	Aivot ja hermosto	3
2.3	Glutamaattireseptorit	6
2.3.1	GluA1-alayksikkö	6
2.3.2	GluA1-poistogeeninen hiirikanta	7
2.3.3	Uuden ympäristön vaikutus hippokampukseen	8
2.3.4	cFos hermosolujen aktiivisuuden markkerina	8
2.4	DREADD-reseptorit	9
2.5	Histologia ja kudoksen värjääminen	12
2.5.1	Kudoksen esikäsittely	12
2.5.2	Immunohistokemia	13
2.6	Mikroskopia	14
2.6.1	Valomikroskopia	14
2.6.2	Fluoresenssimikroskopia	14
3	Tavoitteet	15
4	Materiaalit ja menetelmät	16
4.1	Hiiret	17
4.2	DREADD-reseptorin ilmentäminen GluA1-hiirimallin hippokampuksessa	18
4.3	Aivoleikkeet	20
4.4	Aivoleikkeiden värjäys	20
4.5	Mikroskopia ja kuvankäsittely	22
5	Tulokset	23
5.1	Viruksen injektio kohta	25
5.2	DREADD-reseptorin ilmentyminen ja levinneisyys	28
5.3	cFos-ekspressio ja neuroneiden aktiivisuus	32
5.4	Kehityskohteita	35

6	Päätelmät	36
	Lähteet	38
	Liitteet	
	Liite 1. Käytetyt laitteet ja reagenssit	
	Liite 2. cFos-DAB and mCherry-Fluorescent	
	Liite 3. Virusinjektoiden koordinaatit	
	Liite 4. Kaksisuuntainen ANOVA cFos-soluille	

Lyhenteet

AAV	<i>Adeno-associated virus</i> . Adenovirukseen perustuva virusvektori. On yleisesti käytössä oleva geenivektori ihmisissä.
AMPA	1-amino-3-hydroksi-5-metyyli-iso-oksatsoli-4-propionaatti. Kuuluu ionotrooppisten glutamaattireseptoreiden ryhmään.
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> . Varianssianalyysi. Tilastollinen testi, jonka avulla voidaan selvittää eri ryhmien keskiarvojen tilastollisesti merkitseviä eroja.
cFos	Proto-onkogeneeni. Neuroneiden aktiivisuusmarkkeri.
CNO	<i>Clozapine-N-oxide</i> . Klotsapiini-N-oksidi. Psykoosilääke klotsapiinin metaboliatuote.
DREADD	<i>Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs</i> . Reseptoreita, joiden avulla voidaan tutkia solusignalointia neurotieteen tutkimuksissa.
GluA1	Glutamaattireseptori, AMPA-tyyppi, alayksikkö 1.
GPCR	G-proteiinikytketyt glutamaattireseptorit.
hM4Di	DREADD-reseptori. Heikentää neuroniärsytystä.
KO	<i>Knock out</i> . Poistogeeninen. Hiirimalli, jota on geneettisesti muokattu poistamalla tietty geeni ja estämällä näin kyseisen geenin säätelemä proteiinin tuotto.
mGluR	Metabotrooppiset glutamaattireseptorit. Kuuluvat G-proteiinikytkettyjen reseptorien ryhmään.
NMDA	N-metyyli-D-asparagiinihappo. Kuuluu ionotrooppisten glutamaattireseptoreiden ryhmään.
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> . Fosfaatilla puskuroitu keittosuolaliuos.

PFA	<i>Paraformaldehyde</i> . Paraformaldehydi.
WT	<i>Wild type</i> . Villityyppi. Hiirimalli, jota ei ole muokattu geneettisesti. Käytetään eläinkokeissa kontrolliryhmänä.

1 Johdanto

Kaksisuuntaista mielialahäiriötä sairastaa noin 60 miljoonaa ihmistä maailmanlaajuisesti (Mental disorders 2016). Kaksisuuntainen mielialahäiriö on mielenterveyden häiriö, johon kuuluu mania- sekä masennusjaksoja. Kaksisuuntainen mielialahäiriö jaetaan kahteen eri tyyppiin. Tyypissä 1 mielialahäiriö koostuu manian ja depression vaihtelusta ja tyypissä 2 depressiosta ja hypomaniasta, joka on maniaa lievempi tila. Manian oireita ovat muun muassa kohonnut itsetunto, epärealistiset odotukset omista kyvyistä, harhaillevat ajatukset, unen tarpeen vähentyminen sekä impulsiivinen ja holtiton riskialtis käyttäytyminen. (Bengesser & Reininghaus 2013: 18; Maksimovic 2014: 24–25.)

Eri hoitomuotoja on olemassa mielialahäiriön akuutteihin vaiheisiin sekä retkahduksen estämiseen. Käytössä olevat lääkkeet ovat mielialalääkkeitä, jotka toimivat erityisesti masennusvaiheessa, mutta manian hoidossa on vieläkin paljon haasteita (Mental disorders 2016). Suurinta osaa potilaista tarvitsee hoitaa maniajakson aikana useilla eri lääkkeillä samanaikaisesti, jotta manian hoidossa voidaan saavuttaa edes kohtuullinen tulos. Manian hoitoon on vaikea löytää nopeasti yksilöllistä ja tehokasta hoitomuotoa, joten tehokkaampia ja siedettävämpiä lääkkeitä sekä hoitomuotoja tarvitaan nopeasti. (Vieta & Sanchez-Moreno 2008: 22.)

Tämän insinöörityön tavoitteena on selvittää hermosolujen aktiivisuutta vähentävän reseptorin vaikutusta hippokampuksen neuroneiden aktiivisuuteen poistogeenisessä manian hiirimallissa. GluA1-poistogeeninen hiirimalli valitaan mallintamaan kaksisuuntaisen mielialahäiriön maniavaihetta, ja työn tarkoituksena on selvittää hM4Di-reseptorin vaikutusta tämän hiirikannan neuroneiden aktiivisuuteen aivojen hippokampuksessa aivoleikkeiden ja immunohistokemiallisten värjäysten avulla. Neuroneiden aktiivisuutta tutkitaan värjäämällä ja laskemalla aivoleikkeistä cFos-solut ja suorittamalla tilastollinen testi saaduille tuloksille. Lisäksi selvitetään virusinjektion ja injektion mahdollistavan ohjauskannan sijainti aivokudoksessa aivoleikkeistä sekä DREADD-reseptorin toimivuus ja levinneisyys aivojen eri osa-alueille mCherry-värjäyksen avulla.

Pitkällä tähtäimellä tutkimuksesta saadun tiedon tavoitteena on auttaa löytämään eri hoitomuotoja ja toimiva lääkitys kaksisuuntaisen mielialahäiriön aiheuttaman manian hoitoon. Insinöörityö suoritettiin Helsingin yliopiston Lääketieteellisen tiedekunnan Farmakologian osastolla. Lähiohjaajana työssä toimi tutkijatohtori Teemu Aitta-aho.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Kaksisuuntainen mielialahäiriö

Kaksisuuntainen mielialahäiriö on mielenterveyden häiriö, johon kuuluu mania- sekä masennusjaksoja. Maniavaiheen pituus vaihtelee kahdesta viikosta viiteen kuukauteen ja masennusvaihe on kestoaltaan keskimäärin puoli vuotta (Kaksisuuntainen mielialahäiriö 2013). Kaksisuuntainen mielialahäiriö jaetaan kahteen ryhmään sen perusteella, koostuuko se manian ja depression vaihtelusta vai hypomaniasta ja depressiosta. Hypomania on maniaa lievempi tila. Maniaa kokevat henkilöt sairastavat kaksisuuntaisen mielialahäiriön tyyppiä 1 ja hypomaniata kokevat tyyppiä 2. (Bengesser & Reininghaus 2013: 18; Maksimovic 2014: 24.)

Maniajakson aikana potilaan mieliala kohoaa ja energiatasot nousevat. Tyypillisiä manian oireita ovat kohonnut itsetunto, epärealistiset odotukset omista kyvyistä, harhailevat ajatukset, suuruudenhulluus, unen tarpeen vähentyminen, impulsiivinen ja holtiton riskialtis käyttäytyminen sekä hyperseksuaalisuus. (Bengesser & Reininghaus 2013: 18; Maksimovic 2014: 25.)

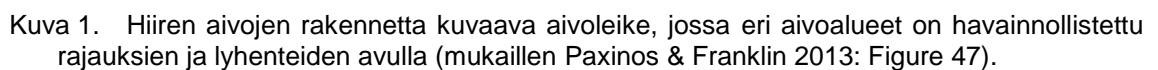
Kaksisuuntaista mielialahäiriötä sairastaa noin 60 miljoonaa ihmistä maailmanlaajuisesti. Eri hoitomuotoja on olemassa mielialahäiriön akuutteihin vaiheisiin sekä repsahduksen estämiseen. Käytössä olevat lääkkeet ovat mielialalääkkeitä, jotka toimivat erityisesti masennusvaiheessa. Manian hoidossa käytettäviä lääkkeitä ovat esimerkiksi litium, valproaatti, karbamatsepiini, aripipratsoli, asenapiini, haloperidoli, ketiapiini, olantsapiini, risperidoni sekä tsiprasidoni. Vaikeiden maniatapausten hoidossa yhdistellään eri lääkkeiden käyttöä. Tehokkain hoitomuoto maniaan on litiumin tai valproaatin tai näiden muiden lääkkeiden yhteiskäyttö yhdessä uudempien psykoosilääkkeiden kanssa. Usein manian lääkityksen lisäksi potilas tarvitsee bentsodiatsepiineja. Hypomanian hoidossa masennuslääkitys pitää lopettaa ja maniaa estävän lääkkeen annostusta tulee suurentaa. Klotsapiinin käyttöä lääkkeenä voidaan harkita hoitoresistentissä maniassa. Useista lääkkeistä on kuitenkin tutkimusnäyttöä, jotka osoittavat niiden olevan tehottomia manian hoidossa. Manian hoidossa on vieläkin useita haasteita erityisesti pitkällä aikavälillä. Suurinta osaa potilaista tarvitsee hoitaa useilla lääkkeillä samanaikaisesti, jotta voidaan saavuttaa edes kohtuullinen tulos manian hoidossa. Manian hoitoon on vaikea löytää nopeasti yksilöllistä ja tehokasta hoitomuotoa, joten tehokkaampia ja siedettävämpiä

lääkkeitä sekä hoitomuotoja tarvitaan nopeasti. (Kaksisuuntainen mielialahäiriö 2013; Mental disorders 2016; Vieta & Sanchez-Moreno 2008: 22.)

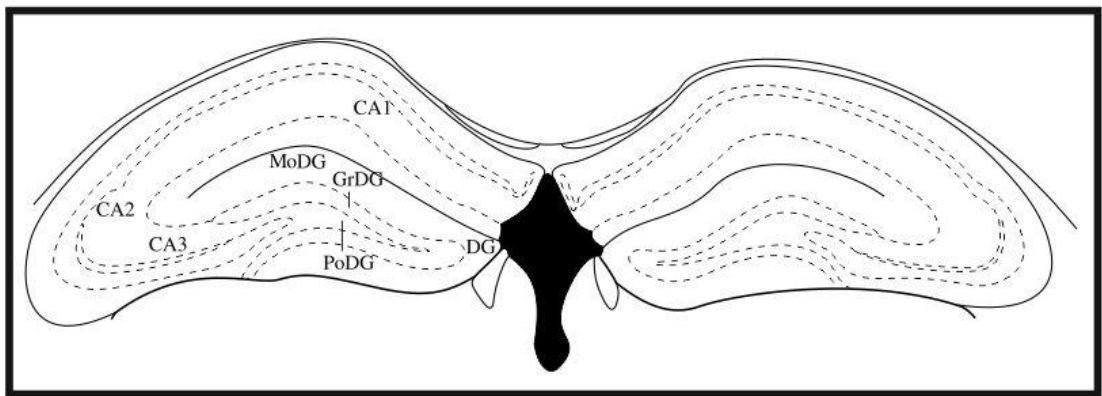
2.2 Aivot ja hermosto

Kaksisuuntainen mielialahäiriö on mielenterveyden häiriö, joten siihen kuuluvat oireet aiheutuvat aivojen toiminnan seurauksena (Bengesser & Reininghaus 2013: 18). Aivot ja hermosto ovatkin kehon suurin viestittävä, ohjaava ja säätelevä järjestelmä. Aivojen tärkeimpiin toimintoihin lukeutuvat sensoriperäisten ärsykkeiden vastaanotto, tiedonvaihto yksilöllisten reseptorikeskusten välillä, ajatteleva, oppiminen ja muistaminen. Hermoston tehtävänä on kerätä ärsyksiä aistinelimien tai solujen reseptoreiden läpi ja lähettää ne hermostojen läpi aivoihin ja selkärankaan elektronisina impulssina. Näissä kohteissa osa tulleesta tiedosta prosessoidaan ja osa muutetaan ohjeiksi, jotka lähetetään kohde-eliimiin laukaistamaan haluttu reaktio. (Ullmann 2009: 126–127.)

Hermosto jaetaan ääreis- ja keskushermostoon. Ääreishermostoon kuuluvat aivo- ja selkäydinhermot, jotka ovat kiinnitettynä keskushermostoon ja kulkevat kauttaaltaan ympäri kehoa. Keskushermosto koostuu aivoista ja selkäytimestä. Koko hermosto rakentuu hermosoluista eli neuroneista sekä gliasoluista. Neuronit ovat hermoston tärkeimpiä osia, ja ihmisen hermostossa on arviolta 100 miljardia neuronia. Neuronit koostuvat solurungosta, mitokondriasta ja endoplasmakalvostosta. Lisäksi sillä on yksi pitkä tietoa eteenpäin vievä viejähaarake eli aksoni sekä useita synapsien välityksellä tietoa tuovia tuojaharakkeita eli dendriittejä. Neuronien tehtävä on välittää tietoa sähköisten sekä kemiallisten signaalintimenetelmien avulla. Sähköisen signaalintimenetelmien avulla tieto siirtyy nopeasti neuronin eri osasta toiseen, kun taas kemialliset välittäjäaineet siirtävät tietoa eri neuronien välillä. Elektronisen impulssin lähettäminen hermostosta kohde-eliimeen tapahtuu synapseissa, joissa sähköinen hermoimpulssi muutetaan kemialliseksi signaaliksi eli välittäjäaineeksi, jota hermoston päätelmissä olevat välittäjäainereseptorit erittävät synapsirakoon. Tämä välittäjäaine sitoutuu seuraavan hermosolun ionikanaviin ja saa aikaan ionikanavien aukeamisen, mistä seuraa impulssi. Impulssi saa aikaan hermosolun aktivoitumisen tai esimerkiksi solun supistumisen. Näin hermoston viestit saavat aikaan hormonien erittymistä, aistimuksia ja liikkeitä. (Nolte 2002: 1–2; Ullmann 2009: 126.)



Aivoturso eli hippokampus on aivoissa sijaitseva alue, joka on sijoittunut ohimolohkojen sisäosaan (kuva 2). Se kuuluu aivojen limbiseen järjestelmään ja näin osallistuu käyttäytymisen ja tunteiden säätelyyn sekä muistitoimintoihin. Hippokampus koostuu kolmesta osasta, joita ovat dentate gyrus, hippocampus proper ja subiculum. Hippocampus proper jakautuu kolmeen eri alueeseen, joita ovat CA3, CA2 ja CA1. Hippokampus välittää tärkeitä aivotoimintoja kuten oppimiseen, muistiin ja spatiaaliseen koodaukseen liittyviä neuronitoimintoja. Hippokampuksella on erityisen tärkeä rooli muistitoiminnoissa, sillä se auttaa tiedosta ja tapahtumista syntyneiden uusien muistojen vakauttamisessa. (Nolte 2002: 62, 570–571; Watson ym. 2011: 113.)



Kuva 2. Rajattu ja pelkistetty kuva hiiren aivojen hippokampuksesta (Bregman ollessa AP –1,94 mm). Kuvassa merkittynä hippokampuksen alueet CA1–CA3 sekä dentate gyrus DG (mukailen Paxinos & Franklin 2013: Figure 47).

Dentate gyrus on kolmikerroksinen kortikaalinen alue hippokampuksessa. Se muodostaa kirjainta c muistuttavan alueen, joka rajautuu ventraalisesti CA1-alueesta ja subiculumista. Kuvassa 2 on hiirten aivoatlaksen aivoleikkeestä (Bregma –1,94 mm) rajattu ja suurennettu hippokampuksen alue, jolla dentate gyrus sijaitsee. Kuvaan on merkitty hippokampuksen alueet CA1, CA2 ja CA3 sekä dentate gyrus (DG) ja sen jyväsolutkerros (*granule cell layer of dentate*, GrDG), polymorfinen kerros (*polymorph layer of dentate gyrus*, PoDG) ja molekyylikerros (*molecular layer of the dentate*, MoDG). (Mai & Paxinos 2012: 906–907.)

Dentate gyruksen pääasiallinen solukerros on jyväsolutkerros. Jyrsijöillä on arvioitu olevan miljoona jyväsoluta dentate gyruksen alueella kun taas vastaava luku ihmisillä on kymmenen miljoonaa (Jonas & Lisman 2014: 1). Dentate gyruksen solu- ja synapsimäärä on korkea, sillä se osallistuu hippokampuksen tiedonkäsittelyyn. Tutkimuksissa

on havaittu, että dentate gyrus toimii hippokampukseen saapuvan tiedon vastaanotto-keskuksena. Se esikäsittelee hippokampukseen tulevan tiedon ja valmistelee sen CA3-alueella tapahtuvaa myöhempää käsittelyä varten. Se esimerkiksi muuntaa entorinaaliselta aivokuorelta tulevan tiedon CA3-alueelle spesifisempään ja helpommin käsiteltävään muotoon. Dentate gyrus myös tuottaa harvan koodausmenetelmän, jossa murto-osa neuroneista ovat aktiivisia kerrallaan. Sillä on siis tärkeä merkitys hippokampuksen neuroneiden oikeanlaisessa toiminnassa. (Mai & Paxinos 2012: 906–907.)

2.3 Glutamaattireseptorit

Glutamaattia esiintyy koko aivojen alueella, ja se onkin aivojen tärkein eksitoiva eli aivojen aktiivisuutta lisäävä välittäjäaine. Sen oikeanlainen toiminta on välttämätöntä aivojen kasvun, kehityksen ja yhteyksien luomisen kannalta. Glutamaattireseptorit osallistuvat neurokemiallisiin prosesseihin, jotka ovat aivojen plastisuuden, muistin ja oppimisen perustana (Pelkonen & Ruskoaho 1998: 181). Aivojen glutamaattitasojen on havaittu olevan korkeammalla kaksisuuntaisen mielialahäiriön maniapotilailla verrattuna terveisiin ihmisiin (Maksimovic 2014: 9, 22). (Traynelis ym. 2010: 406.)

Glutamaattireseptorit jaetaan ionotrooppisiin reseptoreihin (AMPA, NMDA, kainaatit ja delta) ja metabotrooppisiin reseptoreihin (mGluR). Ionotrooppiset reseptorit koostuvat neljästä alayksiköstä, jotka ympäröivät keskushuokosta. Esimerkiksi AMPA-reseptoreilla (1-amino-3-hydroksi-5-metyyli-iso-oksatsoli-4-propionaatti) nämä alayksiköt ovat GluA1–GluA4. Alayksiköiden koostumuksesta riippuen ionotrooppiset reseptorit vaikuttavat Na^+ - tai Ca^{2+} -ionien virtaukseen. Jokainen alayksikkö koostuu neljästä eri alueesta, joita ovat amino-, ligangiin sitoutuva-, transmembraani- ja karboksyyli-alue. (Maksimovic 2014: 11; Traynelis ym. 2010: 407–408.)

2.3.1 GluA1-alayksikkö

AMPA-reseptorit koostuvat GluA1–GluA4-alayksiköistä. GluA1-alayksikköä sisältävät AMPA-reseptorit päästävät lävitseen Na^+ - ja Ca^{2+} -ioneja, ja niiden agonisti eli reseptoreita aktivoiva molekyyli on glutamaatti. AMPA-reseptorien toiminnalla on keskeinen rooli hermoston toiminnan hermistymisessä, mikä vaikuttaa merkittävästi muistiin ja sen muo-

dostumiseen. AMPA-reseptorien GluA1-alayksikön ilmentymisen väheneminen on yhdistetty kaksisuuntaiseen mielialahäiriöön. (Maksimovic 2014: 12, 22–23; Traynelis ym. 2010: 409.)

GluA1-alayksiköt sijaitsevat koko aivojen alueella. Kuitenkin niiden korkein ilmentyminen keskittyy hippokampuksen alueelle. GluA1-alayksikköä sisältävien reseptoreiden puute on pystytty yhdistämään useisiin käytös- ja muistihäiriöihin hiirimalleilla, joilta puuttuvat GluA1-alayksiköt kokonaan. GluA1-/- -hiirimallissa havaittuja käyttäytymiseen liittyviä muutoksia ovat esimerkiksi uutuudesta aiheutuva yliaktiivisuus, masentunut käyttäytyminen, puutteellinen esipulssin esto, alentunut palkkion oppiminen, vähentynyt aggressio sekä heikentynyt lääketoleranssi ja spatiaalinen muisti. GluA1-/- -hiirimallilla kaikista oireista vahvin on uuden ympäristön aiheuttama yliaktiivisuus. (Procaccini ym. 2011: 161–162.)

2.3.2 GluA1-poistogeeninen hiirikanta

Tutkimuskäytössä hiiren etuja ovat sen kohtuullinen koko, elinkyky, tehokas lisääntymiskyky sekä sen perimän helppo muokattavuus. Lisäksi sen perimä vastaa kohtuullisessa määrin ihmisen genomia. Transgeenisten sekä poistogeenisten hiirikantojen käyttö on yleistynyt tutkimuksissa. Nämä hiirimallit auttavat ymmärtämään lääkkeiden toimintaa ja vaikutuksia eläimen käyttäytymisestä aina solutasolla tapahtuviin reaktioihin asti. (Fox ym. 2007: 306.)

GluA1-poistogeeninen hiirikanta on luotu geneettisesti inaktivoimalla AMPA-reseptoreiden alayksikköön kuuluva Gria1-geeni. Kyseinen geeni koodaa GluA1-alayksikköä ja tämän takia kyseisen geenin inaktivaatio estää GluA1-alayksikön proteiinintuoton kokonaan. GluA1-/- -hiirikannalla on normaali kehitys, tyypillinen elinajanodotus sekä hermosolujen dendriittien ja synapsien hieno rakenne ja täten normaali synaptinen viestinvälitys. Kyseinen hiirikanta on siis yleiseltä kehitykseltään ja toiminnaltaan normaali, joten se soveltuu tutkimuskäyttöön. (Procaccini ym. 2011: 162; Zamanillo ym. 1999: 1805, 1808.)

GluA1-/- -hiirimallissa havaittuja käyttäytymiseen liittyviä muutoksia ovat esimerkiksi uutuudesta aiheutuva yliaktiivisuus, masentunut käyttäytyminen, puutteellinen esipulssin esto, alentunut palkkion oppiminen, vähentynyt aggressio sekä heikentynyt lääketole-

ranssi ja spatiaalinen muisti. GluA1-/- -hiirimallilla kaikista oireista vahvin on uuden ympäristön aiheuttama yliaktiivisuus. Aikaisemmissa tutkimuksissa on selvinnyt, että GluA1-/- -hiirten hyperaktiivisuutta voidaan vähentää puuttamalla glutamaattireseptoreiden toimintaan. GluA1-/- -hiirikanta on osoittanut aikaisemmissa tutkimuksissa uutuuden aiheuttamaa hyperaktiivisuutta sekä kognitiivisia ja sosiaalisia puutteita, minkä takia kyseisen hiirikannan on havaittu mallintavan hyvin hyperaktiivista tilaa psykoottisissa mielialahäiriöissä. Kyseisen hiirimallin ja maniaa sairastavien ihmisten oireiden samankaltaisuutta on tutkittu käyttäytymiskokeilla, joissa molempien on havaittu omaavan samanlainen uniikki käyttäytymismalli liikeaktiivisuudessa. Hiirimallin koe-eläimillä sekä maniaasta kärsivillä henkilöillä huomattiin aiheutuvan samankaltaista uutuuden aiheuttamaa hyperaktiivisuutta, jota ei havaittu terveillä eläimillä tai ihmisillä. Näiden ominaisuuksien takia kyseinen hiirimalli mallintaa manian fenotyyppiä hyvin ja sitä voidaan käyttää hyväksi manian tutkimisessa. Se myös soveltuu uusien lääkkeiden testaamiseen mielialahäiriöiden hoidossa. (Perry ym. 2009: 1072, 1077–1078; Procaccini ym. 2011: 161–162.)

2.3.3 Uuden ympäristön vaikutus hippokampukseen

Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että uuteen ympäristöön joutuminen lisää hippokampuksessa olevien neuroneiden ärsytystä GluA1-/- -hiirillä. Hippokampuksen toimintahäiriö on yksi merkittävimmistä tekijöistä, joka johtaa uutuuden aiheuttamaan hyperaktiivisuuteen GluA1-/- -hiirikannalla. Toimintahäiriöt hippokampuksen alueella GluA1-/- -hiirillä on pystytty osoittamaan myös aivojen pykäläpoimun (*dentate gyrus*) solujen muutoksilla. Nämä tulokset osoittavat, että käytettäessä GluA1-/- -hiirikantaa mallintamaan neuropsykiatrisia mielialahäiriöitä, tutkimukset on parasta kohdentaa hippokampuksen soluihin ja niiden muodostumiseen. (Procaccini ym. 2011: 161–162).

2.3.4 cFos hermosolujen aktiivisuuden markkerina

cFos on proto-onkogeneeni, jota ekspressoituu eli ilmentyy joissakin neuroneissa depolarisaation seurauksena. cFos ekspressoituu neuroneissa jänniteherkän kalsiumin siirtyessä solun sisään, ja tämä neuronin eksitaatio johtaa nopeaan ja ohimenevään cFos-induktioon. Tämän takia cFos-aktivaatiota voidaan käyttää hyvin korkean resoluution metaboliemarkkerina neuroneiden toiminnan tutkimisessa aivoissa sekä selkäytimessä (Dragunow & Faull 1989: 261). cFos-proteiinituote voidaan havaita neuroneissa immunohistokemiallisten tekniikoiden avulla. Elektronimikroskooppitutkimuksissa on havaittu,

että neuroneiden eksitaatio aiheuttaa cFos-ekspressiota vain neuroneiden tumassa, eikä esimerkiksi gliasoluissa, endodyymisoluissa tai endoteelisoluissa. Tämän takia cFos-ekspressio on spesifinen markkeri neuroneiden aktiivisuudelle yksittäisen solun tasolla. cFos-ekspressio tumassa on myös tärkeää aktiivisen neuronin fenotyypin selvittämiseksi. Koska cFos ekspressoituu nimenomaan tumassa, voidaan neuronin sytoplasma värjätä jollakin toisella leimalla, jolloin saadaan selville aktiivisen neuronin tyyppi. Tämän lisäksi toinen merkittävä etu cFos-lokalisaation tutkimisessa on sen hienon viivästynyt ilmestyminen. cFos ekspressoituu noin 30–45 minuutin kuluttua neuroneiden stimuloinnista, mikä mahdollistaa koe-eläinten rauhallisen käsittelyn kudosten keräämistä varten. Kudosten keräämisestä ei myöskään täten aiheudu epäspesifistä stressistä johtuvaa neuroneiden aktiivisuutta. (Bullitt 1990: 517; Hoffman ym. 1993: 176–177.)

cFos on siis herkkä molekyylimarkkeri ja sen mittaamista voidaan käyttää apuna uusien lääkehoitojen tehokkuuden määrittämisessä esimerkiksi GluA1-/- -hiirikannassa (Maksimovic 2014: 66). cFos-immunohistokemiaa voidaan käyttää uutuusreaktion aikana eri tavalla aktivoituvien neuroniryhmien tunnistamiseen. Aikaisemmassa tutkimuksessa on havaittu, että GluA1-/- -hiiriltä löytyi enemmän positiivisia cFos-soluja hippokampuksen alueelta kuin kontrollihiiriltä. (Procaccini ym. 2011: 162.)

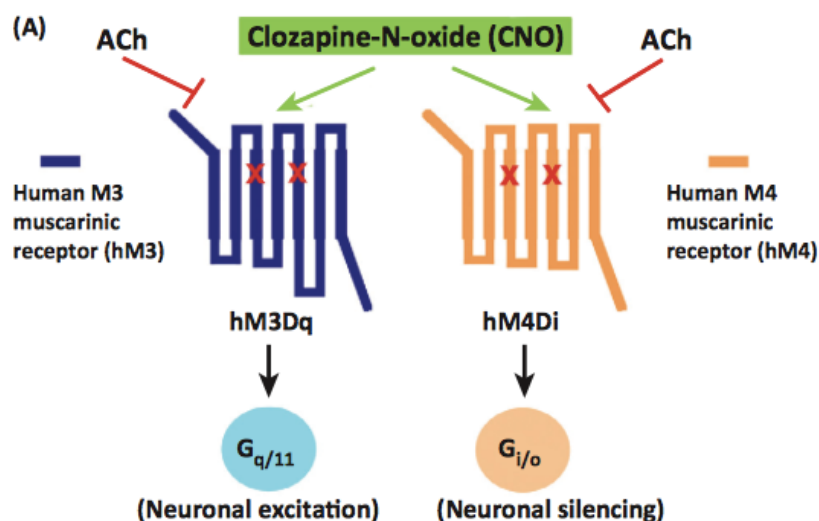
2.4 DREADD-reseptorit

DREADD-reseptorit (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*) ovat uudenlainen työkalu neurotieteen tutkimuksiin. Niiden avulla voidaan tutkia muun muassa solusignalointia, joka ohjaa käyttäytymistä, käsityksiä, tunteita, synnynnäisiä piirteitä ja motoristisia toimintoja eri lajeilla. Kemogenetiikka (*chemogenetics*) määritellään menetelmäksi, jossa proteiineja muokataan niin, että ne aktivoituvat muutoin inerttien pienten molekyylien kemiallisten toimintojen vaikutuksesta. Makromolekyyliä voidaan siis suunnitella ja muokata toimimaan yhdessä aiemmin tunnistamattomien pienten molekyylien kanssa. Tällaisiin makromolekyyliin kuuluvat nukeliinihappohybridit, kinaasit, joukko metabolisia entsyymejä sekä G-proteiinikytketyt reseptorit (GPCR). DREADD-reseptorit ovat pohjimmiltaan muokattuja asetyylikoliinin muskariinisia GPCR-reseptoreja (Whissell ym. 2016: 2). (Roth 2016: 683; Urban & Roth 2015: 400.)

DREADD-reseptorit ovat yksi kemogeneettinen GPCR-alusta, ja niiden käyttömahdollisuudet ovat nostaneet ne hyvin käytetyksi tekniikaksi. Kyseinen tekniikka perustuu

GPCR-reseptoreiden kykyyn aktivoida tai hiljentää neuroninärsytystä. Useimmat DREADD-reseptorit reagoivat klotsapiini-N-oksidiin (CNO). CNO on psykoosilääke klotsapiinin metaboliatuote, ja sillä on ligandilta vaadittuja hyviä ominaisuuksia. Ensinnäkin se on yhdisteenä biologisesti inertti jyrksijöiden aivoissa, sillä siltä puuttuu tarvittava affiniteetti sitoutua kaikkiin natiiveihin keskushermoston kohteisiin. Tämän ominaisuuden ansiosta se sitoutuu selektiivisesti vain DREADD-reseptoreihin eikä metaboloitu klotsapiiniksi, joka estäisi monien herm välittäjäaineiden reseptoreja, mukaan lukien asetyylikoliini. Lisäksi se pääsee kulkemaan veriaivoesteen ohi, mikä mahdollistaa sen annon joko suun kautta tai intraperitonealisesti injektoidulla. (Varela ym. 2016: 2; Whissell ym. 2016: 2.)

Alkuperäinen Gq DREADD- eli hM3Dq-reseptori luotiin ihmisen M3-muskariinireseptorista molekyyli evoluution avulla hiivassa. CNO aktivoi hM3Dq-reseptoria, jolloin se kytkee Gq-välitteisen signaloinnin päälle muun muassa hermosoluissa in vitro- ja in vivo-olosuhteissa. Tutkimukset osoittavat, että tällä menetelmällä aikaan saatu signaali jäljittelee natiivin M3-muskariinireseptorin aktivaatiota asetyyli koliinin avulla. CNO-indusoidun hM3Dq-reseptorin aktivaation aikaansaama lopputulos on solukohtaista. Hermosoluissa kyseinen aktivaatio aiheuttaa depolarisaatiota ja parantaa näin hermosolujen ärtävyyttä, mikä on esitetty kuvassa 3. Tämän takia hM3Dq-reseptoria on käytetty parantamaan neuroninärsytystä ja sen avulla on voitu muokata muistia ja sosiaalista käyttäytymistä hiirillä in vivo. (Roth 2016: 686–687; Urban & Roth 2015: 400.)



Kuva 3. DREADD-reseptorien hM3Dq ja hM4Di rakenteet ja G-proteiinikytkennän ominaisuudet. Reseptoreita ekspressoivien neuroneiden stimulointi CNO:n avulla vahvistaa tai heikentää neuroninärsytystä (Wess ym. 2013: 386).

Kun tutkimuksen tarkoituksena on heikentää neuroninärsytystä ja hillitä hyperaktiivisuutta, käytettäväksi DREADD-reseptoriksi valitaan hM4Di. Kyseisen reseptorin on tutkittu vähentävän neuroninärsytystä hiirillä hippokampuksen soluissa. Reseptori inaktivoi hippokampuksen neuroneita ja on toiminnaltaan hyvin spesifinen. Aiemmissa tutkimuksissa on havaittu, että akuutti kemogeneettinen hippokampuksen solujen inaktivaatio hM4Di-reseptorilla on riittävä heikentämään solujen synaptista yhteyttä. Injektoitaessa kyseistä hM4Di-reseptoria maanisille hiirille niiden kokeman neuroninärsytyksen tulisi siis heikentyä ja näin käytöksen muuttua uuden ympäristön aiheuttamasta yliaktiivisuudesta rauhallisempaan suuntaan. (Zhu ym. 2014: 1881, 1889.)

Tietyle solutyypille spesifinen DREADD-ekspressio voidaan saavuttaa virusvektorin avulla. Virusvektorissa käytetään solutyypille spesifistä promootoria, joka ohjaa DREADD-reseptoreiden ilmentymistä. Promootorin ekspressiota voidaan edelleen ohjata rekombinanttipohjaisella järjestelmällä. Useat DREADD-reseptoreita koodaavat virukset edellyttävät geneettistä rekombinaatiota, jotta ne voivat tuottaa toiminnallisia muokattuja reseptoreita. Yksi mahdollisuus on käyttää adenovirukseen (*adeno-associated virus*, AAV) perustuvaa menetelmää. AAV on yleisesti käytössä oleva geenivektori ihmisissä, joten se on luonnollinen valinta virusvektoriksi ihmistä koskevaan tutkimukseen (Roth 2016: 691). Kyseisessä menetelmässä on mahdollista käyttää hyväksi kahta heterotyyppistä antiparalleelia eli vastakkaissuuntaista rekombinaatiokohtaa. Kyseiset kohdat tehdään käänteiseksi koodaavan sekvenssin osalta, jonka jälkeen molemmat kohdet leikataan. Tämän seurauksena yksi kutakin rekombinaatiokohtaa on vastakkaisesti kääntynyt ja näin kykenemätön uudelleenrekombinaatioon. Tällaisen solutyypille spesifisen rekombinanttiviruksen injektointi hiirelle aiheuttaa solutyypille spesifisen ekspresion. (Urban & Roth 2015: 403; Whissell ym. 2016: 2.)

DREADD-reseptoreiden on osoitettu toimivan hiirillä ja niitä voidaan käyttää hyväksi ihmisten psykiatristen häiriöiden tutkimuksissa neurotieteessä. DREADD-reseptoreiden avulla voidaan mahdollisesti muokata ihmisten käyttäytymistä ja näin löytää eri hoitomuotoja ja toimiva lääkitys esimerkiksi juuri kaksisuuntaiseen mielialahäiriöön. (Whissell ym. 2016: 10.)

2.5 Histologia ja kudoksen värjääminen

Histologialla tarkoitetaan kudossoppia. Yksi tapa tutkia kudosta on tehdä kudoksesta ohuita leikkeitä ja tarkastella niitä valomikroskoopin avulla. Leikkeet voidaan kiinnittää objektilasille, värjätä ja tämän jälkeen tutkia kudoksen eri rakenteita ja komponentteja ja niiden välisiä eroja. Näin voidaan erottaa normaali kudos ja siitä poikkeavat rakenteet toisistaan. Esimerkiksi aivoleikkeistä voidaan värjätä hermosoluja sekä niiden aktiivisuutta merkkavia molekyylejä (cFos) ja näin tarkastella neuroneiden toimintaa aivoissa esimerkiksi kaksisuuntaisen mielialahäiriön manian aikana. (Rantala & Lounatmaa 1998: 65).

2.5.1 Kudoksen esikäsittely

Ennen kudossleikkeiden tekoa kudos on fiksoitava. Fiksoinnin tehtävänä on säilyttää kudoksen rakenne alkuperäisenä ja näin ollen estää autolyysi, bakteeritoiminta ja molekyylien häviäminen jatkokäsittelyssä. Histologiassa useimmin käytettyjä fiksatiiveja ovat aldehydit. Näistä yleisin on formaldehydi, jonka vesiliuosta kutsutaan formaliiniksi. Formaldehydi tunkeutuu kudoksiin nopeasti, mutta sen reaktio kudoksen eri komponenttien kanssa on hidasta. Toinen yleinen fiksatiivi paraformaldehydi (PFA) on kiinteä polymeeri. Paraformaldehydi on hellävaraisempi kuin formaliini, sillä siitä puuttuvat formaliinin epäpuhtaudet. Puskuroituna paraformaldehydiä käytetään monissa tekniikoissa, kuten esimerkiksi immunohistokemiassa. Fiksointi suoritetaan useimmin upottamalla kudoksenäyte fiksatiiviin heti irrottamisen jälkeen. Kokonaisille elimille voidaan myös suorittaa esifiksaatio. Esifiksaatiossa verisuonisto huuhdellaan verettömäksi, jonka jälkeen kudoksen verisuonisto huuhdellaan fiksatiivilla. Näin fiksatiivi pääsee kudokseen verisuoniston kautta. Tämän jälkeen kudos upotetaan vielä fiksatiiviin parhaimman tuloksen saavuttamiseksi. Fiksoinnin päätteeksi kudoksesta pestään ylimääräinen fiksatiivi pois puskuriliuoksen avulla. (Rantala & Lounatmaa 1998: 65–67.)

Jotta kudoksesta saadaan leikattua ohuita leikkeitä kylmämikrotomin eli kryostaatin avulla, täytyy kudos jäädyttää. Jäätymisen seurauksena kudos kiinteytyy leikattavaksi. Jäädytys tulee suorittaa mahdollisimman nopeasti, jotta kudosta rikkovia jääkiteitä ei pääse muodostumaan. Ennen jäädyttämistä kudokselle voidaan suorittaa jäädytys suojaus, jotta kudoksessa oleva vesi ei pääsisi kiteytymään ja näin vaurioittamaan hienorakenteita. Jäädytys suojauksessa käytetään hyväksi vettä sitovia jäädytys suoja-aineita,

jotta vesimolekyyliä ei jää kudokseen vapaaksi. Parhaiten jäädytys suojaus onnistuu kudoksen upottamisella sokeriliuokseen. Jäädytys suojauksen jälkeen jäädytys suoritetaan useimmiten upottamalla kudokset nestetyyppeen tai kylmään isopentaaniin. Isopentaanissa näyte jäätyy tasaisemmin ja säilyttää näin muotonsa paremmin. Jäädytyksen jälkeen kudokset voidaan siirtää pakastimeen odottamaan leikkausta. (Rantala & Lounatmaa 1995: 112; Rantala & Lounatmaa 1998: 69–71.)

2.5.2 Immunohistokemia

Immunohistokemialla tarkoitetaan menetelmää, jonka avulla voidaan havaita tiettyjä antigeenejä kudoksissa tai soluissa sille spesifisellä vasta-aineella. Menetelmä perustuu siis vasta-aineen ja sen antigeenin sitoutumiseen keskenään, mikä voidaan havaita mikroskooppilla merkkiaineen avulla. Leimausmenetelmässä merkkiaine liitetään joko suoraan vasta-aineeseen tai se suoritetaan monivaiheisena prosessina. (Rantala & Lounatmaa 1998: 133.)

Antigeeni on molekyyli, joka tunnistetaan kudoksesta spesifisen vasta-aineen avulla. Vasta-aine sitoutuu antigeenin epitooppiin. Vasta-aineet ovat seerumin proteiineja, joita kutsutaan myös immunoglobuliineiksi. Niitä on viisi eri luokkaa: IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. Immunohistokemiassa käytössä olevista vasta-aineista IgG on yleisin, mutta myös IgM-luokkaa käytetään. Vasta-aine voi olla mono- tai polyklonaalinen. Monoklonaalinen vasta-aine sitoutuu ainoastaan yhteen epitooppiin, kun taas polyklonaalinen vasta-aine sitoutuu saman proteiinin eri epitooppeihin sen sisältämien immunoglobuliinimolekyylien takia. (Rantala & Lounatmaa 1998: 133–135).

Immunofluoresenssimenetelmissä käytetään hyväksi fluorokromeja eli fluoresoivia väriaineita. Fluorokromit absorboivat korkeaenergistä lyhytaaltoista valoa kuten UV-valoa tai laserilla tuotettuja muita valon aallonpituuksia. Tästä energiasta ne käyttävät osan sisäiseen elektronin siirtoon ja täten emittoivat matalaenergistä näkyvää valoa. Immunofluoresenssimenetelmiä on useita erilaisia. Suorassa immunofluoresenssimenetelmässä käytetään vain yhtä fluorokromileimattua antigeenille spesifistä vasta-ainetta. Epäsuorassa immunofluoresenssimenetelmässä käytetään sekä primaari- että sekundaarivasta-ainetta eli värjäys on kaksivaiheinen. Värjäyksen ensimmäisessä vaiheessa leimaamaton primaarivasta-aine sitoutuu tutkittavan antigeenin epitooppiin. Tämän jälkeen suoritetaan toinen inkubaatio, jossa fluorokromimerkitty sekundaarivasta-aine sitoutuu

primaarivasta-aineeseen. Menetelmä on herkempi kuin suora menetelmä ja antaa luotettavamman tuloksen. Fluorokromit havaitaan ja niitä tarkastellaan fluoresenssimikroskopian avulla. (Rantala & Lounatmaa 1998: 136, 140–141.)

Värjäys voi aiheuttaa epäspesifistä vasta-aineiden sitoutumista. Tätä voidaan estää käsittelemällä leikkeitä vetyperoksidi-liuoksessa sekä suorittamalla niille avidiini-biotiinikäsittely. Lisäksi leikkeille tulee suorittaa blokkauksen inkubaatio ennen vasta-ainevärjäystä. Tässä liuoksessa on hyvä käyttää tavallista seerumia, joka on tuotettu samassa eläimestä kuin sekundaarivasta-aine. Näiden keinojen avulla tulisi välttyä epäspesifiseltä sitoutumiselta. (Taylor ym. 2011: 4, 22–23.)

2.6 Mikroskopia

Mikroskopia on merkittävä työkalu modernissa solubiologiassa. Mikroskoopeissa on nykyään useita ominaisuuksia, joiden avulla voidaan kuvantaa biologisia näytteitä jopa solutasolla. Mikroskooppiset menetelmät voidaan jakaa valomikroskopiaan ja fluoresenssimikroskopiaan. Tutkimuksessa rutiinin omaiseen kuvantamiseen epifluoresenssimikroskopia on hyvä lähtökohta, sillä sitä on helppo käyttää, sillä on melko hyvä herkkyys ja sen käyttö on suhteellisen nopeaa. (Thorn 2016: 219, 221.)

2.6.1 Valomikroskopia

Tavallisessa valomikroskopiassa valonlähde ja detektoiva objektiivi ovat sijoitettu näytteen vastakkaisille puolille. Kuva muodostuu näytteen vaikutuksesta valon kulkuun, sillä näyte joko absorboi, siroaa tai taivuttaa valoa. Useimmat solut ovat ohuita ja läpinäkyviä, joten helpoin tapa saada halutut solut näkyviin on värjätä ne, jolloin solut saadaan näkymään tummina vaalealla taustalla. Esimerkiksi tummaksi värjättyjä cFos-soluja voidaan tarkastella valomikroskoopilla. (Thorn 2016: 219.)

2.6.2 Fluoresenssimikroskopia

Fluoresenssimikroskopia on tehokas työkalu solu- ja molekyylibiologian tutkimuksiin. Se soveltuu erityisesti neurobiologian tutkimuskohteisiin, sillä sen avulla voidaan tarkastella solujen fysiologiaa solukomponenttien tasolla. Kudoksista tai soluista pystytään tutkimaan visuaalisesti fysiologisia prosesseja sekä systeemejä. Fluoresenssimikroskopia

mahdollistaa muun muassa proteiinien yhteyksien ja sijaintien, ionien kuljetuksen sekä metabolian tutkimisen. (Combs 2010: 1.)

Fluoresenssimikroskooppeja on useita erilaisia. Useimmissa mikroskoopeissa on päältävalojärjestelmä (*epi-illumination*), jossa mikroskoopin valo tulee nimensä mukaisesti näytteen päältä. Fluorokromit eli fluoroforit ovat kemiallisia molekyylejä, jotka fluoresoivat. Fluorofori absorboi fotoneita, joissa tapahtuvat muutokset virittävät elektronit uuteen tilaan. Lopulta virittäytynyt tila purkaantuu ja absorboitunut energia vapautuu. Näin fluorofori emittoi energiaa ja palaa normaaliin tilaansa. (Webb & Brown 2013: 29–30.)

Fluoresenssimikroskopian vaatimuksena on, että tutkittavan objektin tulee fluoresoida. Fluoresenssilla tarkoitetaan valon emissiota, joka tapahtuu nanosekunteja valon absorption jälkeen. Ero eksitoidun ja emittoituneen aallonpituuden välillä määrittelee fluoresenssin voimakkuuden. Kun filtterin avulla estetään eksitoituva valo, voidaan saada näkyviin vain emittoituva fluoresenssi ja näin nähdä ainoastaan objektit, jotka fluoresoivat. Jopa yksittäiset fluoresoivat molekyylit voidaan saada näkyviin, jos taustassa ei ole paljon autofluoresenssia. Fluoresoivilla vasta-aineilla värjättyjä näytteitä voidaan tarkastella fluoresenssimikroskopian avulla, jolloin värjättyt solut erottuvat värillisinä tummaa taustaa vasten. (Sanderson ym. 2014: 1–2.)

Immuonofluoresenssinäytteillä esiintyy taustafluoresenssia. Tätä aiheuttavat useat tekijät muun muassa kollageeni, lipofuskiini, eri rauhaseritteet, liian suuri primaarivasta-ainepitoisuus, konjugoitumaton fluorokromi, riittämättömät pesut, huono fiksaatio, kudoksen puristuminen ja biotiini. Biotiini voidaan poistaa leikkeistä avidiini-biotiinikäsittelyn avulla. (Rantala & Lounatmaa 1998: 151–153).

3 Tavoitteet

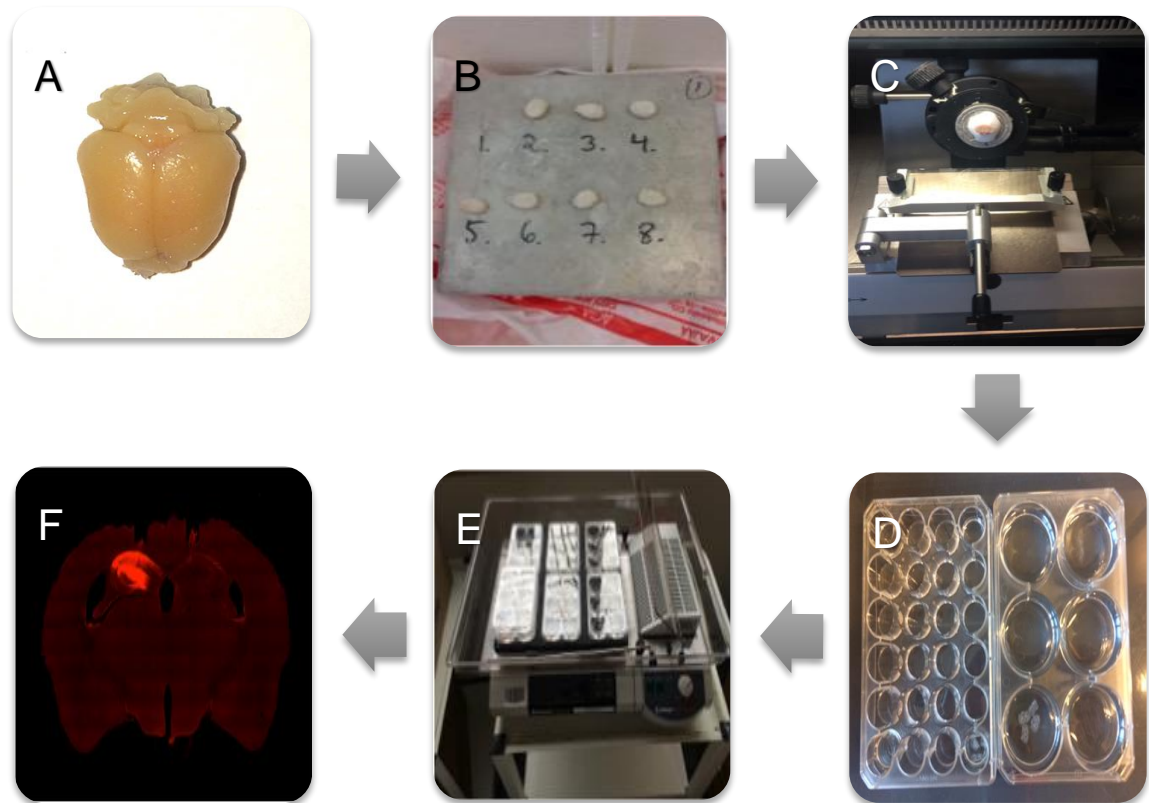
Tämä insinööriö oli jatkoa aikaisemmalle tutkimukselle. Aiemmassa tutkimuksessa havaittiin uuden ympäristön aiheuttavan liiallista cFos-ilmentymistä hippokampusessa GluA1-poistogeenisillä hiirillä. Uudet ärsykkeet aiheuttavat GluA1-/- -hiirillä liiallista hippokampuksen reaktiivisuutta, mikä mahdollisesti saa aikaan hiirten hyperaktiivisen käyttäytymisen. Lääkehoidollisessa tutkimuksessa havaittiin, että hippokampuksen liiallista aktiivisuutta voitiin heikentää glutamaatin muunteluun perustuvilla hoitomuodoilla

GluA1-/- -hiirillä. Hippokampuksen neuroneiden aktiivisuuden vähenemistä arvioitiin mitaamalla cFos-ilmentymisen muutoksia kyseisellä aivoalueella. (Procaccini ym. 2011: 161–162).

Tämän insinöörityön tarkoituksena oli selvittää neuroneita hiljentävän DREADD-reseptorin vaikutusta hippokampuksen neuroneiden aktiivisuuteen GluA1-poistogeenisessä manian hiirimallissa. Neuroneiden aktiivisuutta tutkittiin värjäämällä ja laskemalla aivoleikkeistä cFos-solut ja suorittamalla tilastollinen testi saaduille tuloksille. Lisäksi selvitettiin virusinjektion ja injektion mahdollistaneen ohjauskanyylin sijainti aivokudoksessa aivoleikkeistä sekä DREADD-reseptorin toimivuus ja levinneisyys aivojen eri osa-alueille mCherry-värjäyksen avulla.

4 Materiaalit ja menetelmät

Tutkimus ja toteutus koostuivat neljästä eri vaiheesta, joita olivat hiirille annettavat virusinjektiot ja aivojen perfuusio, aivoleikkeiden teko, immunohistokemiallisen värjäyksen suunnittelu ja toteutus sekä mikroskopia ja kuvankäsittely. Kuvassa 4 on havainnollistettu työn eri vaiheiden etenemistä vaihekuvien avulla.



Kuva 4. Työn eri vaiheiden eteneminen. A) perfusoidut hiiren aivot, B) aivojen jäädyttäminen kuivajäällä, C) aivojen leikkaaminen kryostaatilla, D) aivojen värjäys 24- ja 6-kuoppalevyillä, E) värjäyksen inkubointivaihe ravistelijassa, F) mikroskoopilla otettu kuva värjätystä aivoleikkeestä.

Kuvassa 4 on esitetty työn eri vaiheita, joita ovat A) aivojen perfusointi, B) aivojen jäädyttäminen, C) aivoleikkeiden leikkaaminen kryostaatilla, D–E) aivoleikkeiden värjääminen sekä F) mikroskopointi ja kuvankäsittely. Työssä edettiin vaiheittain ja osa työvaiheista suoritettiin useampaan kertaan. Työssä käytetyt laitteet ja reagenssit on esitetty liitteessä 1.

4.1 Hiiret

Tutkimuksen ensimmäisessä vaiheessa valittiin tutkimusasetelmaa vastaava hiirimalli, jonka avulla voitiin tutkia kyseisten DREADD-reseptoreiden toimintaa. Kyseisessä tutkimuksessa valittiin käytettäväksi GluA1-poistogeeninen hiirikanta, jonka avulla mallinnetaan kaksisuuntaisen mielialahäiriön maniavaihetta. Kyseisiltä hiiriltä on inaktivoitu AMPA-reseptoreiden alayksikköön kuuluva Gria1-geeni, jolloin sen koodaavan GluA1-

alayksikön proteiinintuotto estyi. Kontrolliryhmäksi tutkimukseen valittiin luonnollisesti villityypin hiiret eli GluA1+/+ -hiirikanta. Kaikki tutkimuksessa käytetyt GluA1-/- -hiiret sekä villityypin kontrollihiiret GluA1+/+ saatiin jalostuksesta. Hiiristä otetuille näytteille suoritettiin genotyyppitys hiirten perimän varmistamiseksi ennen kokeiden aloitusta. (Procaccini ym. 2011: 162; Zamanillo ym. 1999: 1805, 1808.)

Tutkimukseen valittiin yhteensä 21 koe-eläintä. 11 hiiristä oli poistogeenisiä (*knock out*, KO) ja 10 villityyppiä (*wild type*, WT). Kaikki hiiret satunnaistettiin antamalla jokaiselle numero 1–20, jotta tutkimuksen aikana ei tiedetty, mihin ryhmään jokainen hiiri kuului eikä täten voitu tietoisesti vaikuttaa tai ohjailla tutkimuksen tuloksia. Molemmista ryhmistä noin puolelle annettiin lääkeaineena CNO:ta (*Clozapine-N-oxide*, 3 mg/kg liuoksena 10 ml/kg vatsakalvon onteloon) ja puolelle kontrollina pelkkää kantoainetta eli vehikkeliä (0,9 % NaCl – 0,5 % DMSO). Poistogeenisistä hiiristä 6 sai CNO-liuosta ja 5 vehikkeliä, kun taas villityypin hiiristä 5 sai CNO-liuosta sekä 5 vehikkeliä.

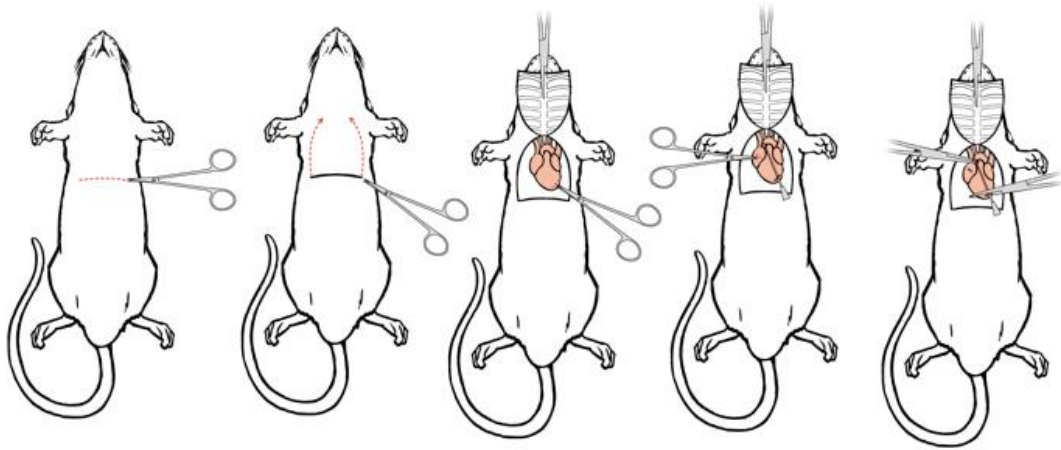
4.2 DREADD-reseptorin ilmentäminen GluA1-hiirimallin hippokampusessa

Koe-eläimille annettiin virusinjektio, jonka tarkoituksena oli viedä tutkittavat DREADD-reseptorit halutulle aivojen alueelle. Hippokampuseseen injektoidavaksi virukseksi valittiin AAV-CamKIIa-hM4Di-mCherry. CaMKII toimii promootorina, jolla DREADD-reseptorit ilmennettiin glutamaattisoluissa. Promootoriin liitettiin siis suoraan DREADD-reseptori, jonka perään liitettiin mCherry.

Injektio toteutettiin ohjauskanyylin avustuksella, jossa kaksi palkilla yhdistettyä kanyyliä oli kiinnitetty hiiren aivoihin. Näiden ohjauskanyylien sisään laitettiin neula, jossa virus oli. Virus injektioitiin aivoihin ohjauskanyylin sisällä olleen neulan kautta haluttuun kohtaan aivoissa. Injektio pyrittiin kohdistamaan koordinaatteihin anteriorinen-posteriorinen (*anterior-posterior*, AP) –1,94; mediaalinen-lateraalinen (*medial-lateral*, ML) +/- 1,00 ja dorsaalinen-ventraalinen (*dorsal-ventral*, DV) –2. Koordinaatit mitattiin hiirille annettavia injektioita varten tehdyn mittakehikon avulla, jolloin tiedettiin, mihin kohtaan ja miten syvälle aivoihin neula tuli asettaa. Injektion jälkeen neula ja kanyylit poistettiin hiiren päästä.

Virusinjektioiden jälkeen hiiret jätettiin kahdeksi viikoksi elämään normaalia elämäänsä. Tämän ajan kuluessa odotettiin viruksen asettuvan aivoihin ja reseptorin proteiinintuotannon alkavan ja muuttuvan maksimaaliseksi ja vakaaksi.

Odotusajan jälkeen hiirille suoritettiin perfuusio ja aivojen kerääminen. Aina ennen perfuusiota valmistettiin tuore 4-prosenttinen PFA-liuos (PBS:ssä). Perfuusio aloitettiin antamalla hiirelle Mebunat-nukutusainetta injektiona vatsaan. Hiiren vaivuttua anestesiaan se kiinnitettiin alustaan ja liuospumpussa kiinni oleva neula työnnettiin sydämen vasempaan kammioon. Sydämen oikeaan eteiseen tehtiin veitsellä viilto, jotta veri pääsi poistumaan suonistosta. Perfuusion kirurgiset vaiheet on esitetty kuvassa 5. Tämän jälkeen pumppu laitettiin päälle ja 1xPBS-liuosta (0,13 M NaCl – 7 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O – 3 mM H₂NaO₄P) kierrätettiin hiiren verisuoniston läpi veren poistamiseksi. Liuos vaihdettiin 5 minuutin jälkeen 4-prosenttiseen PFA-liuokseen. PFA polymerisoituu hiiren elimistössä ja jähmettää kudokset muuttumattomiksi pysäyttämällä entsyymien toiminnan ja mikrobien kasvun. Lopuksi hiiren aivot kerättiin varovasti talteen kallon sisältä.



Kuva 5. Kirurgiset vaiheet perfuusion suorittamiseksi hiirelle (Gage ym. 2012: 4).

Aivot siirrettiin PFA-liuosta sisältävään 15 ml:n falconputkeen ja niiden annettiin olla jääkaapissa yön yli. Seuraavana päivänä aivot siirrettiin jääkaappiin 30-prosenttiseen sukroosiliuokseen. Aivoja säilytettiin sukroosiliuoksessa, kunnes aivoissa oleva vesi oli korvautunut sokeriliuoksella. Tällöin solut eivät päässeet hajoamaan ja repeämään jäädytyksen aikana. Veden korvautuminen kesti noin 1–2 päivää ja kun aivot olivat vajonneet sukroosiliuoksessa falconputken pohjalle, ne olivat valmiita jäädytystä varten (kuva 4A).

Ennen aivojen jäädytystä ne pestiin 1xPBS-liuoksella, jotta ylimääräinen sukroosi saatiin poistettua aivojen pinnalta. Tämän jälkeen aivot siirrettiin kuivajäällä olevaan isopentaniin. Aivojen annettiin olla isopentaanissa noin 10 sekunnin ajan, jonka aikana aivojen uloin kuori jäättyi ja muutti väriään valkoiseksi. Tämän jälkeen aivot siirrettiin kuivajäällä

olevan metallilevyn päälle jäätymään lopullisesti yhden tunnin ajaksi (kuva 4B). Jäädymyksen jälkeen aivot käärittiin parafilmiin ja folioon ja siirrettiin pakastimeen $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilaan säilytykseen.

4.3 Aivoleikkeet

Jäädytetyt aivot leikattiin Leica CM3050S -kryostaatilla $40\text{ }\mu\text{m}$ paksuiksi aivoleikkeiksi. Ennen leikkauksen aloittamista aivot siirrettiin -80 -asteisesta syväjäähdytimestä sulamaan -20 -asteiseen kryostaattikammioon tunnin ajaksi. Tämän jälkeen aivot liimattiin näytealustaan ja niiden asento säädettiin suoraan, jolloin leikatessa saatiin ehjiä ja suorita leikkeitä suoristinasin ja metallialustan väliin (kuva 4C). Ensimmäisten näytteiden kohdalla leikkeitä tehtiin koko aivoista, mutta myöhemmin havaittiin, että pelkän hippokampuksen alueen leikkeet riittävät tutkimukseen. Aivoleikkeiden kerääminen aloitettiin hieman ennen hippokampusta ja sitä jatkettiin vähän kyseisen kohdan yli. Jokaisesta aivosta arvioitiin myös injektio kohta sekä sen sijainti Bregmaan nähden hiirten aivoatlakseen avustuksella.

Aivoleikkeet siirrettiin leikkauksen jälkeen pensselin avulla 24-kuoppalevyille jäätymisenesto-liuokseen ($0,5\times\text{PBS} - 25\text{ }\%$ etyleeniglykolia – $25\text{ }\%$ glyserolia). Yhteen kuoppaan pipetoitiin noin $1\text{--}2\text{ ml}$ liuosta, johon siirrettiin maksimissaan 5 valmista leikettä. Kuoppalevyn kansi tiivistettiin parafilmin avulla ja kanteen merkittiin sen sisältämän näytteen tiedot selkeästi näkyviin. Kuoppalevyjä säilytettiin pakastimessa $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa aivoleikkeiden värjäykseen asti.

4.4 Aivoleikkeiden värjäys

Aivoleikkeet värjättiin, jotta aivoalueilta saatiin näkyviin DREADD-reseptorit sekä cFos-solut. Eri värjäysmenetelmiä suunniteltiin kolme erilaista ja näitä jokaista testattiin parhaan lopputuloksen selvittämiseksi. Taulukossa 1 on kerrottu eri värjäysmenetelmissä käytetyt vasta-aineet, niiden käytetyt pitoisuudet inkubaatiossa sekä valmistaja ja tuotenumero.

Taulukko 1. Eri värjäysmenetelmissä käytetyt vasta-aineet, inkuboinnissa käytetyt pitoisuudet sekä tuotteiden valmistajat ja tuotenumerot.

Värjäys- mene- telmä	cFos- primaari- vasta-aine	cFos- sekundaari- vasta-aine	mCherry- primaari- vasta-aine	mCherry- sekundaari- vasta-aine
Värjäys 1	goat anti-cFos 1:250 Santa Cruz Biotechnology sc-52-G	donkey anti-goat 488 1:1000 Life Technologies A11055	rabbit anti-mCherry 1:500 Abcam ab167453	donkey anti-rabbit 594 1:1000 Abcam ab150076
Värjäys 2	goat anti-cFos 1:250 Santa Cruz Biotechnology sc-52-G	donkey anti-goat 405 1:1000 Abcam ab175664	rabbit anti-mCherry 1:500 Abcam ab167453	donkey anti-rabbit 594 1:1000 Abcam ab150076
Värjäys 3	goat anti-cFos 1:800 Santa Cruz Biotechnology sc-52-G	horse biotinylated anti-goat 1:200 Vector BA-9500	rabbit anti-mCherry 1:800 Abcam ab167453	donkey anti-rabbit 594 1:1000 Abcam ab150076

Ensimmäisessä värjäysmenetelmässä molemmat primaarivasta-aineet liuotettiin ensimmäisenä päivänä samaan aikaan blokkaukspuskuriin ja vastaavasti toisena päivänä molemmat sekundaarivasta-aineet laitettiin inkubointiin samanaikaisesti. Kyseinen menetelmä kesti kaksi päivää ja siinä käytettiin vain pesuja, blokkauksta ja vasta-ainevärjäystä. Toisessa värjäysmenetelmässä kokeiltiin uutta sinisenä fluoresoivaa cFos-sekundaarivasta-ainetta. Molemmat primaarivasta-aineet laitettiin inkubointiin taas samanaikaisesti kuten myös sekundaarivasta-aineetkin. Kolmannessa värjäyksessä kokeiltiin uutta cFos-sekundaarivasta-ainetta suuremmalla pitoisuudella. Lisäksi mCherry-primaarivasta-aineen pitoisuutta inkuboinnissa vähennettiin. Tässä värjäyksessä suoritettiin ensin cFos-värjäys ja tämän jälkeen mCherry-värjäys erillisenä, joten värjäys kesti yhteensä kolme päivää.

Värjäys kesti kerrallaan kolme päivää ja se suoritettiin liitteen 2 mukaan. Jokaisesta aivosta valittiin enintään 4 leikettä yhdelle värjäyskierrokselle. Jokaisen aivon leikkeet käsiteltiin omissa kuoppalevyissä, jolloin tiedettiin varmasti, mikä leike oli peräisin mistäkin

aivosta. Ennen jokaista ohjeessa olevaa virallista pesua leikkeille suoritettiin esipesu, joka koostui kolmesta erillisestä minuutin mittaisesta pesusta. Kaikki värjäykseen kuuluvat pesut suoritettiin 6-kuoppalevyillä (kuva 4D) tilavuuden maksimoimiseksi ja pesutuloksen paranemiseksi. Kaikki inkuboinnit sen sijaan suoritettiin 24-kuoppalevyillä (kuva 4D), jotta tilavuus oli mahdollisimman pieni ja vasta-aineita tarvittiin mahdollisimman vähän. 24-kuoppalevyille pipetoitava kokonaistilavuus oli aina 500 µl värjäyksen jokaisessa vaiheessa. Kaikki pesut ja inkuboinnit suoritettiin kuoppalevyjen ollessa ravistelijassa (kuva 4E). Värjäyksen jälkeen leikkeet siirrettiin 1xPBS-liuoksen avulla mikroskooppilasille, jossa ne suoritettiin ja mahdolliset irronneet osat aseteltiin paikoilleen pensselin avulla. Asettelyn jälkeen lasit suojattiin valolta ja ylimääräisen nesteen annettiin kuivua pois noin tunnin ajan. Lopuksi lasille lisättiin muutama tippa mounting mediaa, jonka avulla leikkeiden päälle liimattiin peitinlasi. Värjättyjä leikkeitä säilytettiin mikroskooppilasikotelossa valolta suojattuna +4 °C:n lämpötilassa.

4.5 Mikroskopia ja kuvankäsittely

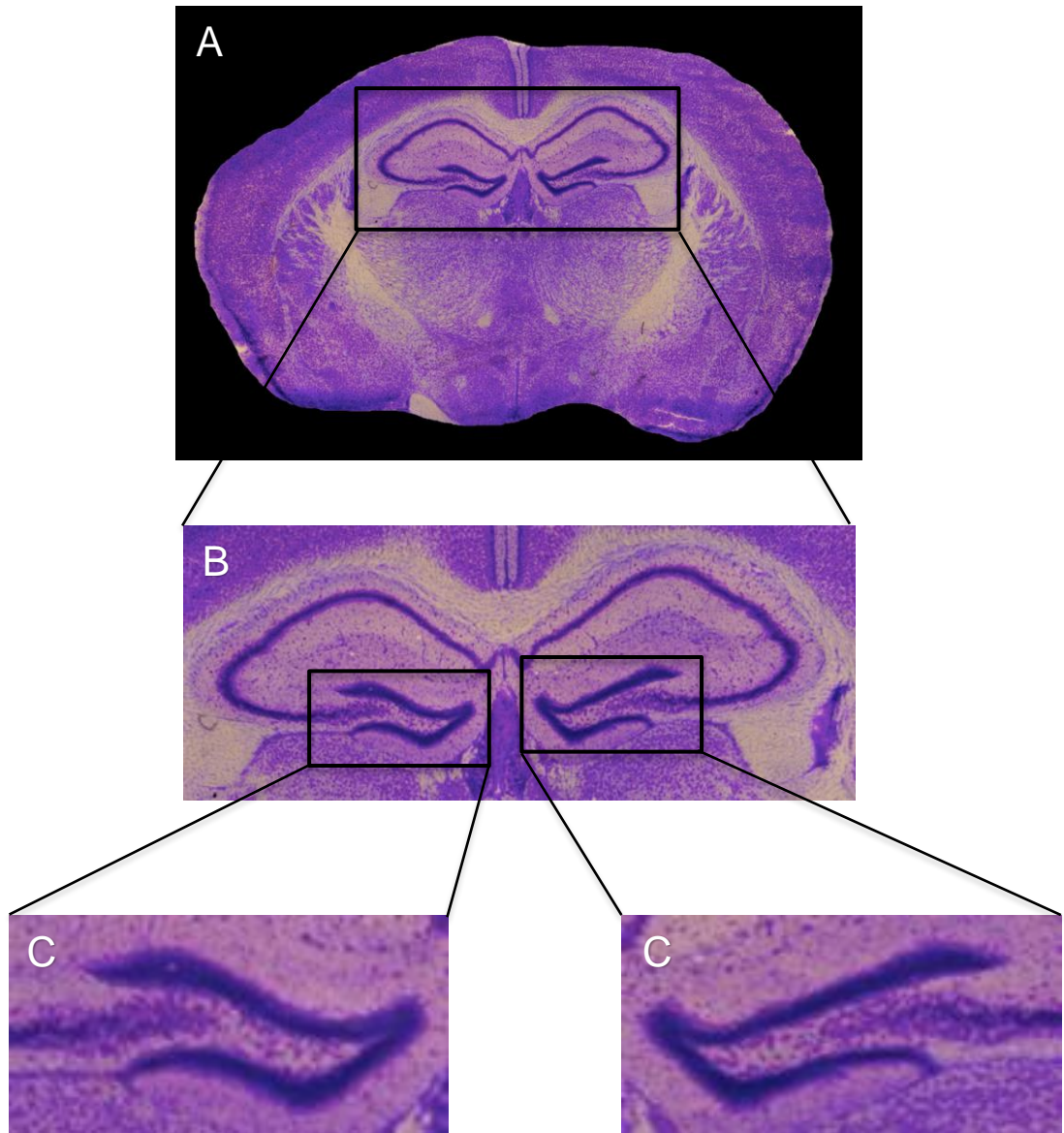
Värjätyt aivoleikkeet mikroskoipoitiin sekä fluoresoivalla että tavallisella valolla. Leikkeissä olevan mCherry-fluoresenssileiman takia leikkeet kuvattiin 594 nm:n aallonpituudella. Kuvissa mCherry näkyi punaisena (kuva 4F). Tavallisella valolla kuvatessa cFos näkyi mustina pisteinä. Kuvat otettiin 20-kertaisella suurennoksella tiling-menetelmällä rajaamalla alue hippokampuskeeseen. Tämä tarkoittaa sitä, että mikroskooppi ohjelmoitiin ottamaan rajatulta alueelta useampi pienempi kuva ja liittämään kuvat yhdeksi isoksi kokonaisuudeksi. Yhden aivoleikkeen hippokampuskeksen kuvaamisessa kului noin 20–30 minuuttia.

Kuvista selvitettiin DREADD-reseptorin leviämistä mCherryn avulla koko aivojen alueelle. Lisäksi tutkittiin mCherryn ja cFos-ekspressioiden päällekkäisyyttä soluissa eli sitä näkyikö punaista ja mustaa leimaa päällekkäin. Viimeiseksi tutkittiin eri hiirten cFos-ekspressiota hippokampuskeksen alueella laskemalla 20-kertaisista hippokampuskesta otetuista kuvista värjäytyneet cFos-solut jokaisesta aivosta erikseen. Solumäärien tilastollisesti merkitseviä eroja tutkittiin tekemällä tuloksille varianssianalyysi eli kaksisuuntainen ANOVA (*analysis of variance*).

5 Tulokset

Työssä haluttiin selvittää virusinjektion ja injektion mahdollistaneen ohjauskanyylin sijainti aivokudoksessa aivoleikkeistä, DREADD-reseptorin levinneisyyttä aivojen eri osueille sekä kyseisen neuroneita hiljentävän DREADD-reseptorin vaikutusta neuroneiden aktiivisuuteen GluA1-poistogeenisessä manian hiirimallissa cFos-proteiinin ilmentymisen avulla. Oletuksena oli, että DREADD-reseptori hM4Di olisi vähentänyt hippokampuksen neuroninärsytystä GluA1-hiirikannalla. Tämä tarkoittaa sitä, että hiirten kokema uuden ympäristön aiheuttama hyperaktiivisuus olisi laskenut ja niiden maaninen käytös rauhoittunut. DREADD-reseptoreiden toimivuutta haluttiin selvittää cFos-ekspression avulla. Tämä tarkoittaa sitä, että DREADD-reseptoreita merkkava punainen mCherry-fluoresenssileima ja solun aktiivisuutta merkkavaa musta cFos-piste tulisi löytyä samasta solusta. Tällöin voidaan todeta DREADD-reseptorin toimivan. Muualta hippokampuksen alueelta cFos-ekspression olisi pitänyt vähentyä GluA1-hiirillä verrattuna kontrolliryhmään.

Ennen oikeiden näytteiden leikkaamista ja värjäämistä haluttiin varmistaa, että aivoleikkeiden teko sujuu ja hiirten aivoatlaksen avulla on mahdollista määrittää oikea leikkauskohta aivoista. Oikean kohdan löytymisen varmistettiin tekemällä aivoleikkeitä harjoitus-aivoista ja värjäämällä näistä leikkeistä solujen sytoplasma Tioniini-värjäyksellä leikkeen rakenteiden hahmottamiseksi. Värjäykset tehtiin 40 µm paksuille leikkeille. Kuvassa 6 on tioniinivärjätty aivoleike Bregman ollessa -1,94 ja suurennos hippokampuksesta ja molemmista dentate gyruksen alueista.



Kuva 6. 10-kertaisella suurennoksella otettu kuva tioniinilla värjätystä 40 μ m paksuisesta hiiren aivoleikkeestä, jossa solujen sytoplasma on värjätynyt violetiksi. A) aivoleike Bregman ollessa -1,94, B) tarkennus hippokampukseen ja C) suurennokset dentate gyruksen alueista.

Kuvista havaittiin, että aivojen oikea kohta kyseiselle tutkimukselle on löydettävissä leikkauksen aikana ja aivoleikkeiden teko tutkimuksessa voidaan kohdistaa hippokampuksen dentate gyruksen alueesta saataviin leikkeisiin.

Alkukokeissa havaittiin, että paras värjäystulos saavutettiin käytettäessä kolmatta värjäysmenetelmää (taulukko 1). Käytetty cFos-primaarivasta-aine oli goat anti-cFos ja sekundaarivasta-aine horse anti-goat. mCherryn primaarivasta-aine oli rabbit anti-mCherry ja sen sekundaarivasta-aine donkey anti-rabbit 594. Tätä värjäysmenetelmää alettiin optimoida parhaimman lopputuloksen saavuttamiseksi. Havaittiin, että oli parempi suorittaa

cFos- ja mCherry-vasta-aineiden inkubaatiot erillään toisistaan ja ensin tehdä koko cFos-värjäys ja vasta tämän jälkeen mCherry-värjäys. Lisäksi selvitettiin, että vetyperoksidi-käsittely sekä avidiinin ja biotiinin käyttö värjäyksessä vähensivät taustan muodostumista. Havaittiin myös, että näytteille kannatti suorittaa kaupallisen ABC-kitin käsittely sekä DAB-värjäys, jotta cFos-solut saatiin paremmin näkyviin mustina pisteinä. Näin saatiin kehitettyä cFos-DAB ja mCherry-fluoresenssivärjäys ja tämä värjäysmenetelmä valittiin käytettäväksi kaikkien aivoleikkeiden lopulliseen värjäykseen (liite 2).

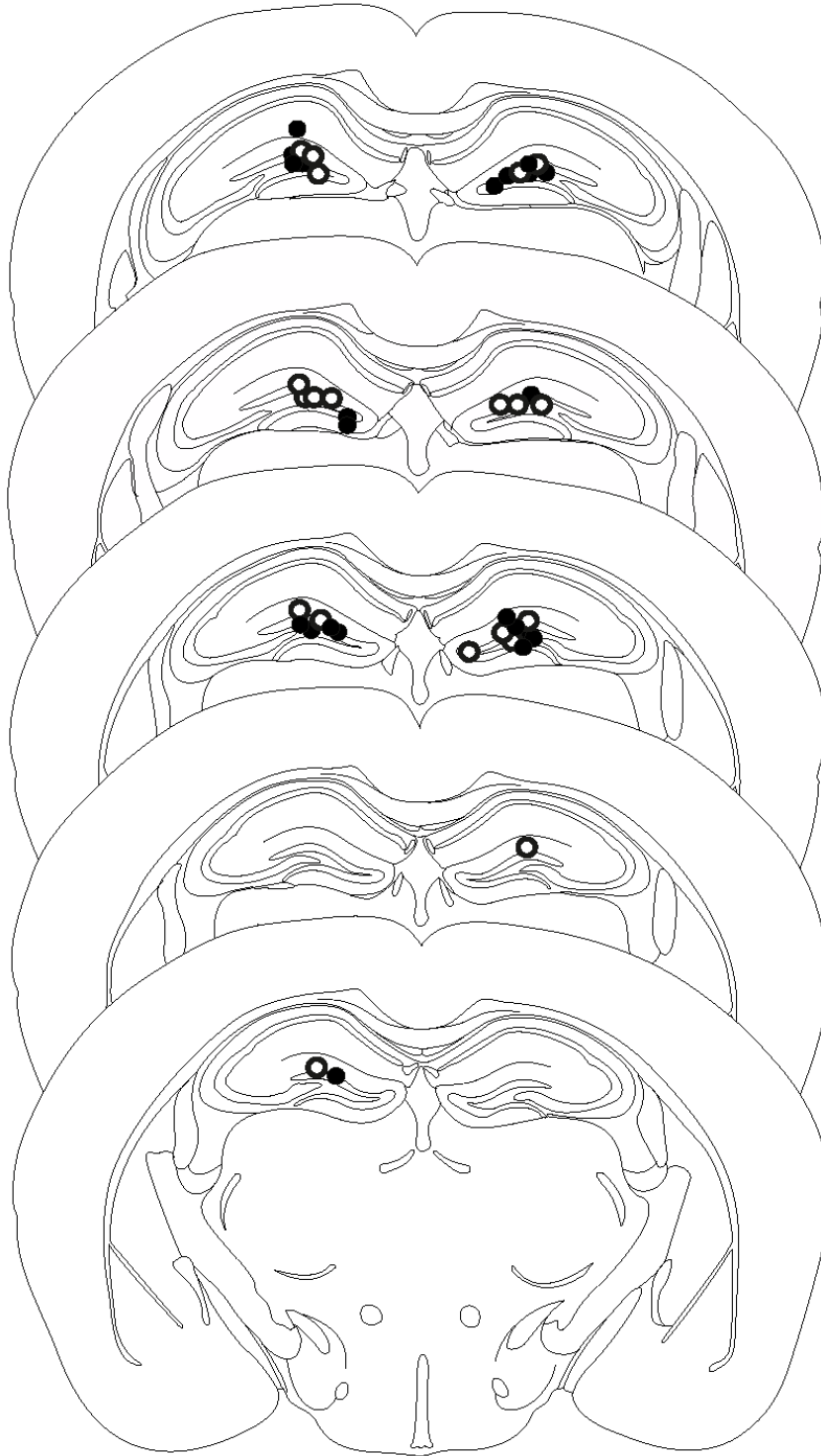
5.1 Viruksen injektio kohta

Virusinjektio hiirten aivoihin toteutettiin ohjauskanyyllilla, jossa kaksi palkilla yhdistettyä kanyyliä oli kiinnitettyinä hiiren aivoihin. Näiden ohjauskanyyliin sisään laitettiin neula, jonka avulla virus injektioitiin halutulle aivoalueelle. Injektio pyrittiin kohdistamaan koordinaatteihin AP $-1,94$; ML $\pm 1,00$ ja DV $-2,0$. Tämä tarkoittaa sitä, että oikea injektio kohta etu-takasuunnassa oli $-1,94$ mm:n etäisyydellä Bregmasta, ylä-alasuunnassa $1,00$ mm:n etäisyydellä ja $-2,0$ mm:n syvyydellä. Toteutuneet injektio kohdat arvioitiin aivoleikkeitä leikattaessa, sillä kohdat näkyivät mustina alueina ja joistakin aivoista pystyi näkemään lisäksi injektioneulan jäljet. Koordinaattien arvioinnissa käytettiin apuna hiirten aivoatlasta. Liitteessä 3 olevassa taulukossa 2 on esitetty jokaisesta aivosta havaitut injektio kohdat.

Liitteen 3 taulukosta havaitaan, että injektio kohtien koordinaatit vaihtelevat $-1,7$ mm ja $-2,27$ mm:n välillä. Noin kymmenessä eli puolessa näytteistä ainakin toinen injektio oli osunut haluttuun koordinaattiin $-1,9$. Muut injektio kohdat vaihtelevat näytteestä riippuen. Ohjauskanyylin ollessa vinossa luonnollisesti toinen injektio kohta oli toista puolta edempänä. Tällöin injektiot osuivat eri koordinaateille. Mitä enemmän ohjauskanyyli oli vinossa, sitä kauempana injektio kohdat olivat toisistaan. Suurimmassa osassa näytteistä injektio kohdat eivät olleet hyvin kaukana toisistaan. Poikkeuksena kuitenkin viimeinen näyte numero 21, jossa ohjauskanyyli on ollut selkeästi vinossa ja injektio kohdat ovat siksi jopa $0,48$ mm:n päässä toisistaan. Kaikkien muiden näytteiden injektio kohdat ovat olleet tätä lähempänä toisiaan tai täsmälleen samassa kohdassa.

AP-koordinaattien lisäksi oli tarpeen arvioida injektioiden syvyyttä sekä onnistumista myös ML-suunnassa. Kuvassa 7 on koottu yhteen jokaisesta aivosta havaitut kolme

koordinaattia eli todelliset kolmiulotteiset injektiokohdat. Kuvassa on 5 aivoleikettä peräkkäin kronologisessa järjestyksessä alkaen ensimmäisenä aivoleikkeitä tehtäessä eteen tulevasta leikekohdasta, jolle injektiokohtia sijoittui. Kuvan aivoleikkeiden koordinaatit ovat liikuttaessa alhaalta ylös AP $-1,70$; $-1,82$; $-1,94$; $-2,06$ ja $-2,18$ Bregmasta. Injektion ML-koordinaatin ja syvyyden voi havaita kyseisistä leikkeistä injektiokohdan sijoittumista kuvaavan pisteen avulla. Kuvassa on havainnollistettu myös poistogeenisten (KO) ja villityypin (WT) koe-eläinten injektiokohtien jakaumaa kuvaamalla KO-hiirten injektiokohdat mustalla täytettyinä pisteinä ja WT-hiirten valkoisella täytettyinä pisteillä.



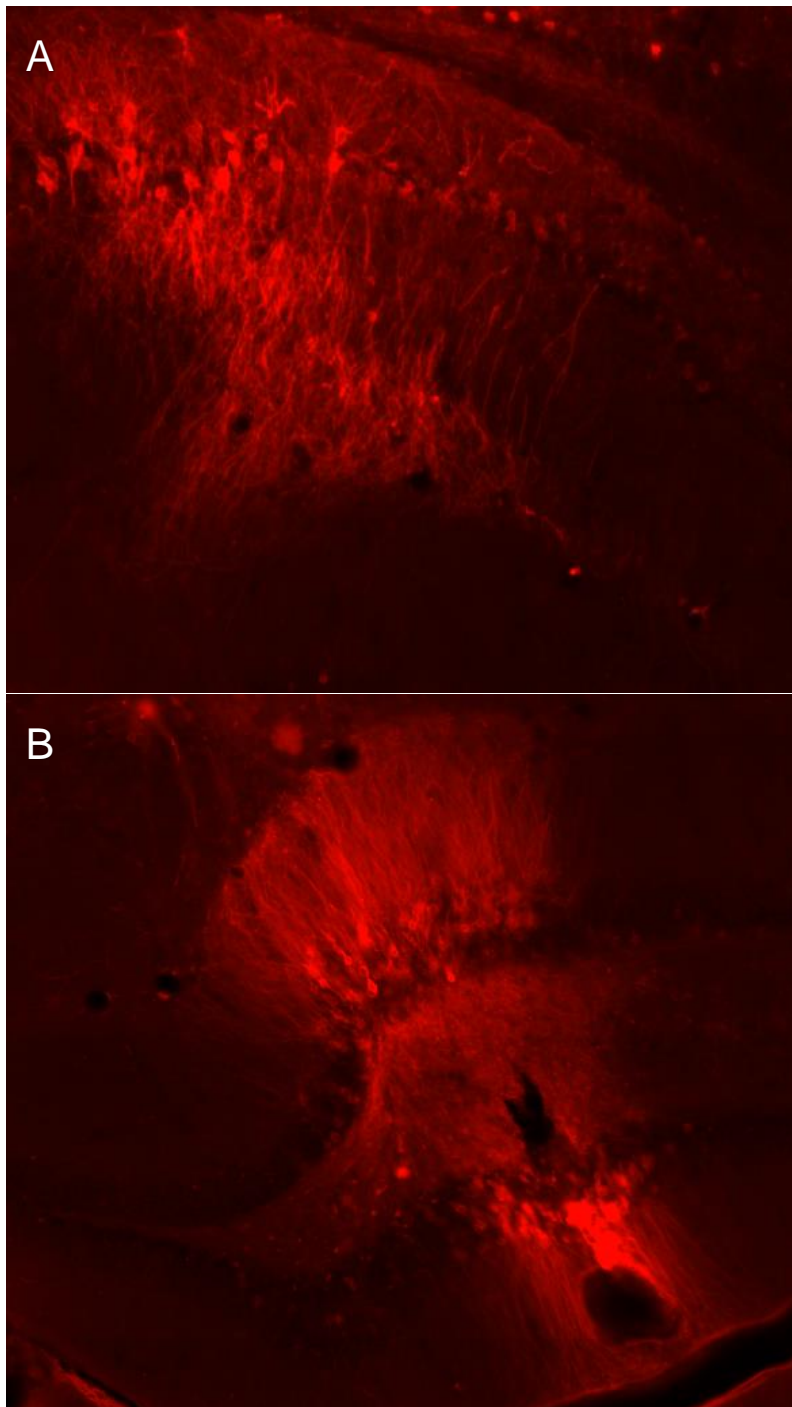
Kuva 7. Kuva viruksen injektiokohdista. Kuvan aivoleikkeiden koordinaatit ovat liikuttaessa alhaalta ylös AP $-1,70$; $-1,82$; $-1,94$; $-2,06$ ja $-2,18$ Bregmasta. Poistogeenisten hiirien (KO) injektiokohdat on merkitty mustilla pisteillä ja villityypin hiirten (WT) valkoisilla pisteillä. (mu-
kailten Paxinos & Franklin 2013: Figure 45-49.)

Kuvasta 7 havaitaan, että KO- ja WT-hiirten välisillä injektiokohdilla ei ole ollut huomattavaa vaihtelua, vaan molemmilla hiirimalleilla injektiokohdat ovat pysyneet samoilla alueilla eivätkä injektiot ole aiheuttaneet epäluotettavaa vaihtelua hiirityyppien välille.

Osassa aivoista injektio oli onnistunut halutulla tavalla, sillä ohjauskanyyli oli asetettu suoraan ja molemmat injektiot olivat osuneet haluttuihin koordinaatteihin. Osassa aivoista havaittiin, että ohjauskanyyli oli ollut himan vinossa. Kaikki injektiot olivat kuitenkin pienestä vaihtelusta riippumatta osuneet halutulle aivoalueelle ja tutkimus oli onnistunut injektioiden osalta halutulla tavalla.

5.2 DREADD-reseptorin ilmentyminen ja levinneisyys

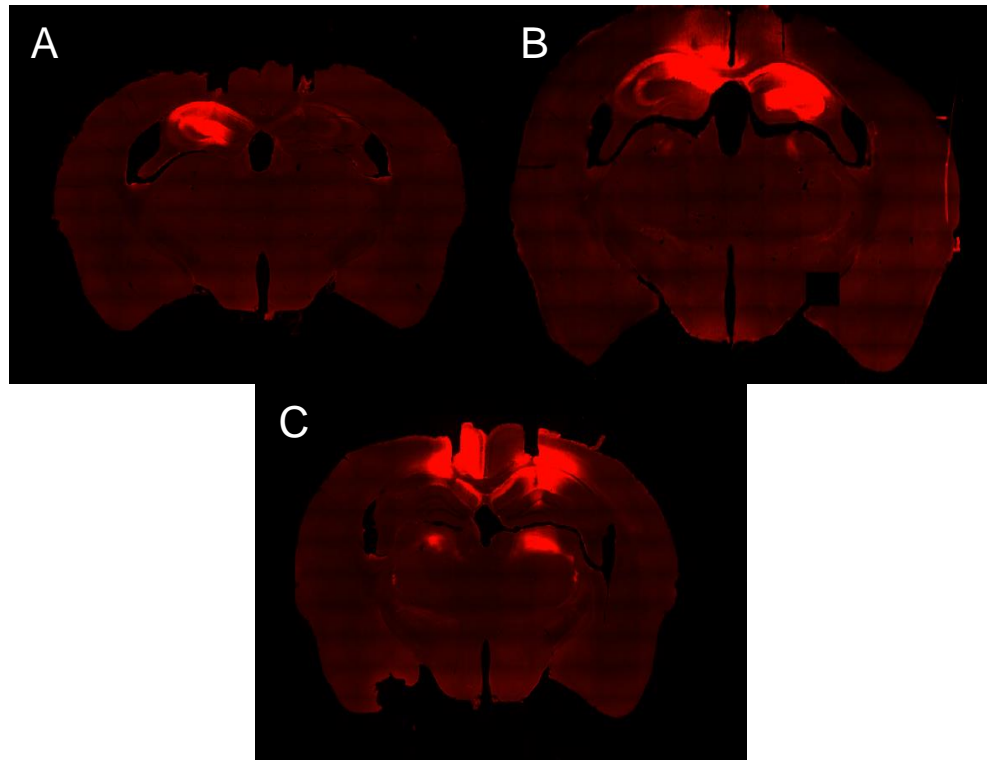
DREADD-reseptoreiden sijaintia aivoissa selvitettiin aivoleikkeiden fluoresenssivärjäyksen avulla, jossa punainen mCherry-leima merkkasi DREADD-reseptorin ilmentymistä. Aivoleikkeistä pystyttiin havaitsemaan yksittäisiä mCherryllä värjäytyjä soluja ja neuroneita. Kuvassa 8A on havaittavissa mCherryllä värjäytyneitä neuroneita, joissa solu näkyy pistemäisenä ja aksonit rihmamaisina. Kuvassa 8B on injektioneulan lävistämä dentate gyruksen alue, jossa positiivia neuroneita löytyy alueen molemmin puolin.



Kuva 8. A) 20-kertaisella suurennoksella otettu kuva 40 μm paksuisen aivoleikkeen dentate gyruksen alueesta, jossa neuronit on värjätty mCherry-fluoresenssivärjäyksellä. B) 20-kertaisella suurennoksella otettu kuva 40 μm paksuisen aivoleikkeen dentate gyruksen alueesta, jossa neuronit on värjätty mCherry-fluoresenssivärjäyksellä. Injektioneula on lävistänyt koko dentate gyruksen alueen ja positiivisia soluja löytyy alueen molemmilta puolilta.

DREADD-reseptorit olivat pysyneet pääosin hippokampuksen alueella. Muutamassa aivossa havaittiin myös reseptoreiden levinneisyyttä injektiokohdan ympärillä. Tämä joh-

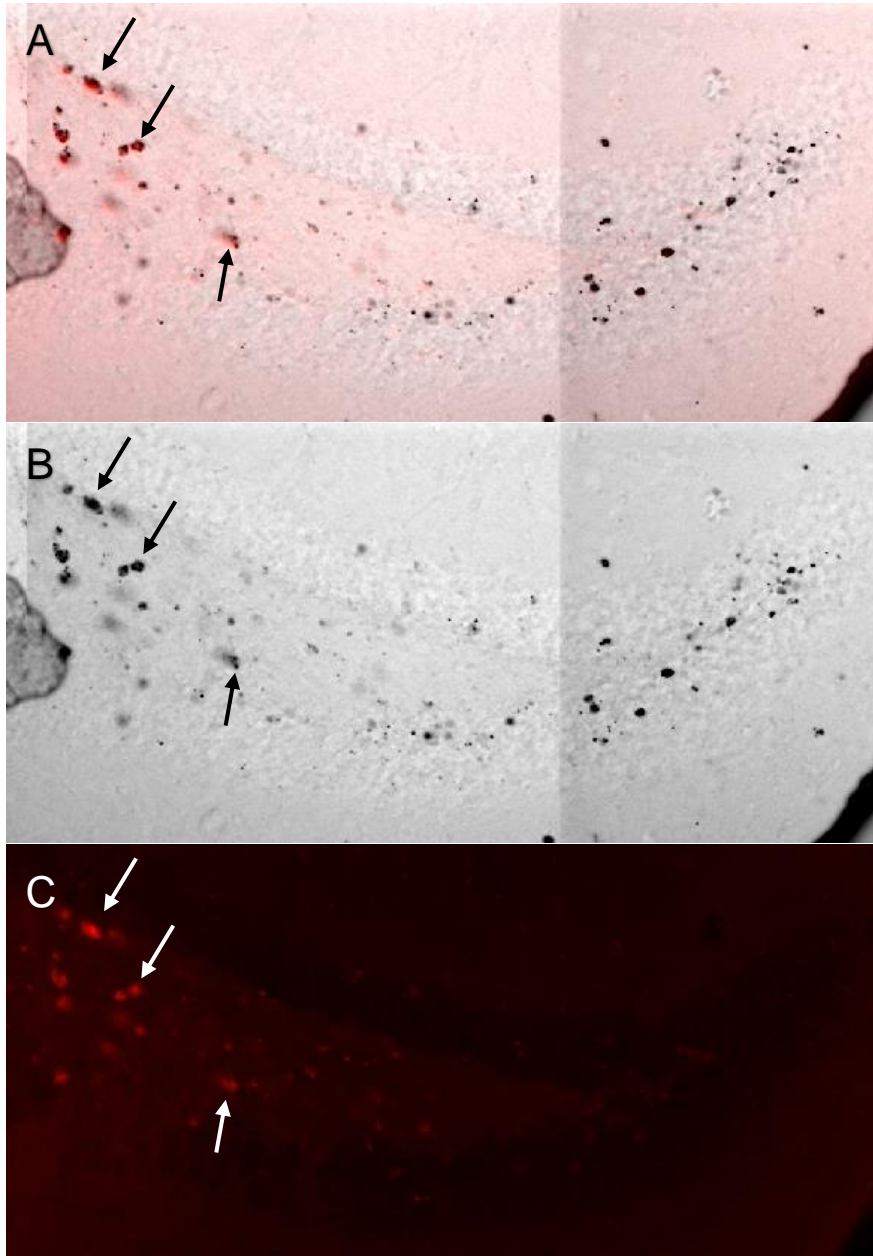
tuu injektioneulasta ja sen aiheuttamasta injektiofluoksen leviämisestä neulan pistokohdan ympärille. Kuvassa 9 on esitetty kolme erilaista injektiotapausta, joissa kuvassa A injektio on onnistunut vain toiselle puolelle, kuvassa B injektio on osunut molemmille puolille ja kuvassa C injektio on osunut molemmille puolille, mutta on levinnyt neulan kulkemalle matkalle ja ohittanut dentate gyruksen alueen.



Kuva 9. 10-kertaisella suurennoksella otetut kuvat 40 μ m paksuisista mCherryllä värjätystä aivoleikkeistä. A) injektio on onnistunut vain vasemmalle puolelle, B) injektio on osunut molemmille puolille ja C) injektio on levinnyt neulan kulkureitin varrelle ja ohittanut dentate gyruksen alueen.

DREADD-reseptoreiden sijainnin lisäksi haluttiin selvittää DREADD-reseptoreiden toimivuutta. Solujen aktiivisuutta merkaava musta cFos-piste tulisi löytyä samasta solusta mCherry-leiman kanssa, jolloin voimme todeta DREADD-reseptorin toimivan. Osassa aivoista pystyttiin havaitsemaan mCherry- ja cFos-positiivisia soluja dentate gyruksen alueelta. Kuvassa 10 on kolme eri filtterillä otettua kuvaa 40 μ m aivoleikkeen oikean puolen dentate gyruksen alueesta. Kuvassa 10A on yhdistettynä kuvassa 10B oleva valomikroskooppikuva sekä kuvassa 10C oleva 594 nm:n fluoresenssikuva. Kuvista havaitaan, että valomikroskooppikuvassa cFos-solut näkyvät mustina pisteinä (kuva 10B) ja 594 nm:n kuvassa mCherry-värjätty DREADD-reseptorit näkyvät punaisina pisteinä

(kuva 10C). Yhdistetystä kuvasta (kuva 10A) selviää, että osa näistä soluista on samanaikaisesti sekä mCherry- että cFos-positiivisia, mistä voidaan todeta DREADD-reseptoreiden toimivan.



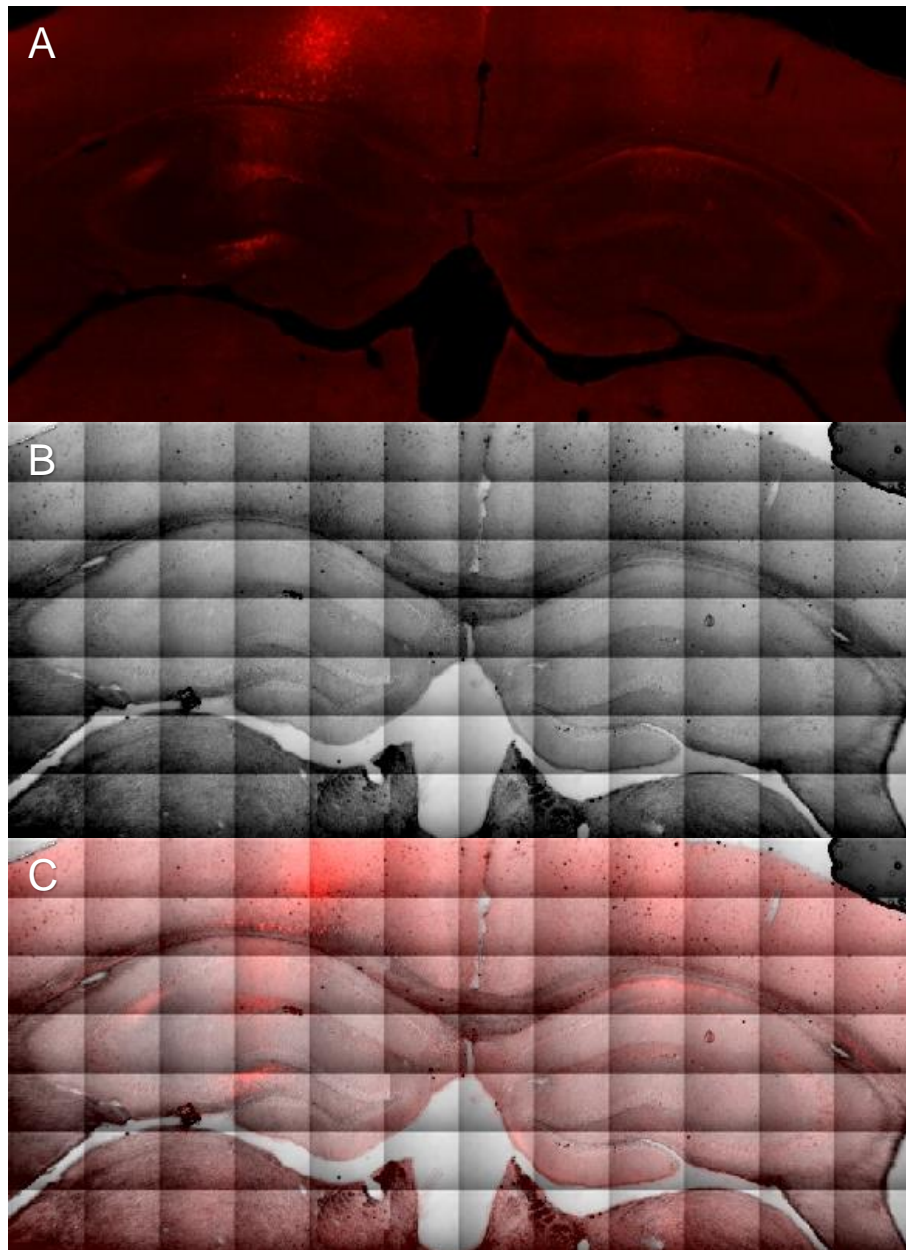
Kuva 10. 20-kertaisella suurennoksella otettu kuva 40 μm aivoleikkeen oikean puolen dentate gyruksen alueesta. A) 594 nm:n fluoresenssikuva ja valomikroskooppikuva yhdistettynä, B) valomikroskooppikuva, jossa cFos solut ovat värjäytyneet mustiksi pisteiksi, C) 594 nm:n fluoresenssikuva, jossa mCherry-värjätyt DREADD-reseptorit näkyvät punaisina pisteinä.

DREADD-reseptorit eivät olleet levinneet ympäri aivoja, vaan niiden esiintyminen keskityi siis hippokampuksen sekä injektio kohdan ympärille. Joissakin aivoleikkeissä resep-

torien punainen fluoresenssiväri oli havaittavissa koko aivoalueella kuvatessa taustafluoresenssina, mikä hankaloitti reseptorin spesifistä paikantamista. Kuvista havaittiin myös, että cFos ja mCherry ekspressoituivat osittain samoissa soluissa, mutta näiden paikantaminen oli paikoitellen hankalaa eikä jokaisesta aivosta saatu luotettavia tuloksia.

5.3 cFos-ekspressio ja neuroneiden aktiivisuus

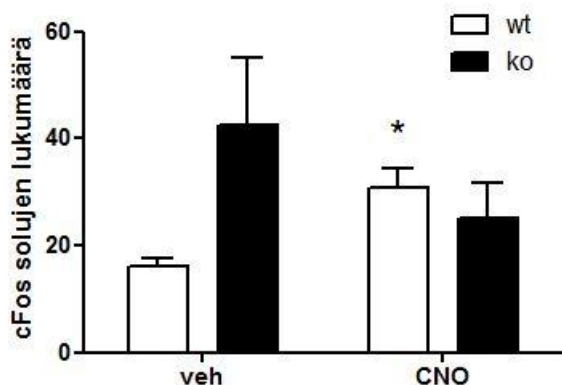
Mikroskooppikuvista havaittiin, että cFos-ekspressiota löytyi sekä hippokampuksen että aivokuoren alueelta (kuva 11B). cFos-ilmentymistä eli solujen aktiivisuutta arvioitiin jokaisesta aivosta laskemalla cFos-soluja hippokampuksen alueesta otetuista kuvista. Kuvassa 11B on 20-kertaisella suurennoksella otettu kuva hippokampuksen alueesta, jonka avulla cFos-laskenta suoritettiin.



Kuva 11. 20-kertaisella suurennoksella tiling-menetelmällä otettu kuva aivojen hippokampuksen alueesta. A) 594 nm:n fluoresenssikuva, B) valomikroskooppikuva ja C) molemmat kuvat yhdistettyinä.

Jokaisesta aivosta laskettiin cFos-solut dentate gyruksen alueelta aivojen molemmilta puolilta. Saaduista tuloksista laskettiin eri genotyypeille ja lääkekäsittelyille keskiarvo. Solulaskennan tulokset analysoitiin ja niistä piirrettiin kuvaaja GraphPad Prism 5 -ohjelmalla. Kaikkien eri ryhmien tulosten keskiarvojen välillä olevia tilastollisesti merkittäviä eroja analysoitiin kaksisuuntaisella ANOVA:lla eli varianssianalyysillä. Eri genotyyppien

ja lääkekäsittelyiden eroa tutkittiin parittoman t-testin avulla. Kuvassa 12 on esitetty solulaskennan tulokset pylväsdiagrammina ja liitteessä 4 olevassa taulukossa 3 on varianssianalyysin tulokset taulukkomuodossa.



Kuva 12. Aivoleikkeistä laskettujen cFos-solujen lukumäärä poistogeenisissä (ko) sekä villityypin (wt) hiirissä dentate gyruksen alueella. Tähti kuvaa tilastollisesti merkitsevää eroa villityypin (wt) saamien eri lääkekäsittelyiden (veh, CNO) välillä. Muut genotyyppien tai lääkeaineiden väliset erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, mutta ryhmien välillä esiintyi interaktiota.

Villityypin (WT) ja poistogeenisen (KO) hiirikantojen väliset erot solulaskennan tuloksissa eivät olleet tilastollisesti merkitseviä (p-arvo 0,1859). Lääkkeiden (veh, CNO) väliset erot eivät olleet myöskään tulosten perusteella tilastollisesti merkitseviä (p-arvo 0,8639). Yhteisvaikutus eli interaktio oli kuitenkin tilastollisesti merkitsevä. Tämä tarkoittaa sitä, että päävaikutuksia ei voi tarkastella erillisinä, vaan on otettava huomioon kaikkien tekijöiden vaikutus yhteen muuttujaan. Tämä tekee tulosten tarkastelusta haastavampaa, sillä tekijät vaikuttavat toisiinsa eri tavoin. Villityypin hiirillä CNO näytti lisänneen cFos-aktiivisuutta, kun taas poistogeenisillä hiirillä CNO laski cFos-aktiivisuutta.

Saman hiirityypin saaman eri lääkehoidon vaikutuksista havaittiin, että poistogeenisen hiirimallin eri lääkekäsittelyiden välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa p-arvon ollessa 0,2366. Sen sijaan villityypin eri lääkekäsittelyiden p-arvo oli 0,0066 ja lääkekäsittelyiden välillä oli täten tilastollisesti merkitsevä ero. Vehikkelilääkittyjen villityypin ja poistogeenisten hiirten välillä p-arvolla 0,0744 ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa, kuten ei myöskään CNO-lääkittyjen villityypin ja poistogeenisten hiirten välillä p-arvolla 0,4955.

DREADD-reseptori hM4Di:n oletettiin vähentäneen hippokampuksen neuroninärsytystä poistogeenisellä GluA1-hiirikannalla ja cFos-ekspression olisi pitänyt vähentyä poistogeenisillä hiirillä verrattuna villityypin kontrolliryhmään CNO-käsittelyllä. Solulaskennan tulokset tältä osin olivat kuitenkin tilastollisesti merkitsemättömiä. Kuvasta 12 kuitenkin havaitaan, että CNO-lääkityillä poistogeenisillä hiirillä cFos-soluja löytyi hippokampuksen alueelta keskiarvoltaan hieman vähemmän kuin vehikkelilääkityltä kontrolliryhmältä. Tämä tukee puolestaan kyseiselle hiirikannalle aikaisemmin suoritettua käytöskoetta, jossa poistogeenisten hiirten käytös oli rauhoittunut ja niiden kokemaa uuden ympäristön aiheuttama manian hyperaktiivisuus oli laskenut (Procaccini ym. 2011: 161–162).

5.4 Kehityskohteita

Jatkotutkimusten kannalta on oleellista pohtia työssä ilmenneitä vaikeuksia ja epäkohtia sekä pohtia mahdollisia tapoja suorittaa aiheeseen liittyviä lisätutkimuksia. Tutkimuksessa oli mukana 21 koe-eläintä, jotka kuuluivat neljään eri ryhmää genotyypin ja lääkeshoidon mukaan. Hiirten määrä oli tilastollisen merkitsevyyden arvioinnin kannalta hieman alhainen, joten olisi suotavaa käyttää suurempaa koe-eläinmäärää jatkotutkimuksissa.

Injektiokohtien ja värjäysten tulkinnan luotettavuuden kannalta olisi hyvä värjätä vielä enemmän leikkeitä laajemmalta alueelta ja kuvata hippokampuksen alue mahdollisimman monesta leikkeestä. Näin saataisiin selville eri aivoissa ja leikkeissä esiintyvää vaihtelua ja pystyttäisiin paremmin arvioimaan luotettavia tuloksia. Lisäksi mCherryn aiheuttamaa taustafluoresenssia voisi pyrkiä vielä vähentämään ja värjäyksen spesifisyyttä voisi arvioida paremmin eri kontrollinäytteiden avulla.

cFos-immunohistokemian käyttämiseen neuroneiden aktiivisuutta mittavana molekyyli-markkerina sisältyy useita potentiaalisia ongelmia. Tietyillä aivoalueilla ei tapahdu cFos-ekspressiota riippumatta neuroninärsytyksestä, sillä kyseisiltä aivoalueilta puuttuvat vaaditut biokemialliset lähetit, jotka säätelevät cFos-aktivaatiota neuroneissa. Lisäksi on mahdollista, että havaitut markkerit ovat taustan fosfaattisidonnaisia proteiineja eivätkä itsessään cFos-proteiineja. cFos-ekspression perustasoon vaikuttaa suuresti kudoksen kokemaa historia 1–12 tunnin ajalta ennen kudoksen keräämistä. Täten suurin cFos-ekspressio sekä sen häviäminen vaihtelevat suuresti eri aivoalueiden välillä ajan funktiona. Tämän takia on vaikeaa ajoittaa kudoksen kerääminen täsmälleen oikein. Lisäksi cFos-positiivisten solujen laskeminen suoritettiin manuaalisesti laskemalla värjäytyneitä soluja

mikroskooppikuvista. Tämä voi aiheuttaa vaihtelua solumäärissä visuaalisen subjektiivisen arvioinnin perusteella kuvien laadusta riippuen (roskat, liima, heikkolaatuinen kuva). Olisi parempi suorittaa laskenta useammasta kuin yhdestä kuvasta jokaisen aivon kohdalla ja laskea näistä tuloksista keskiarvo kyseiselle koe-eläimelle. Lisäksi olisi hyvä automatisoida laskentaa jonkin kuvankäsittelyohjelman avulla. Näin saataisiin tarkempia tuloksia, joiden suuruus ei vaihtelisi niin paljon eri näytelaaduista riippuen. (Dragunow & Faull 1989: 263.)

Kyseinen tutkimus olisi hyvä toistaa uudelleen näitä parannuksia noudattaen, jotta saataisiin paremmin selville saatujen tulosten luotettavuus ja yhdenmukaisuus. Uutena tutkimuskohteena voitaisiin selvittää mitkä solut olivat aktiivisia cFos-värjäyksessä eli selvittää kyseiseltä aivoalueelta aktiiviset solutyyppit. Koska cFos-aktiivisuutta havaittiin myös aivokuoren alueella, yhtenä tutkimusvaihtoehtona voitaisiin myös pitää aivokuoren hermosolujen hiljentämistä ja tämän vaikutusten tutkimista.

6 Päätelmät

Insinöörityössä tutkittiin hermosolujen aktiivisuutta vähentävän DREADD-reseptorin vaikutusta neuroneiden aktiivisuuteen GluA1-poistogeenisessä manian hiirimallissa. Työ koostui neljästä eri vaiheesta, joita olivat hiirille annettavat virusinjektiot ja aivojen perfuusio, aivoleikkeiden teko, immunohistokemiallisen värjäyksen suunnittelu ja toteuttaminen sekä mikroskopia ja kuvankäsittely.

Työssä selvitettiin, että virusinjektio ja injektion mahdollistaneen ohjauskanyylin sijainti oli optimaalinen ja virusinjektiot onnistuivat aivoihin halutulla tavalla. DREADD-reseptori oli pysynyt pääosin halutulla hippokampuksen alueella, mutta sen lokalisaatiota samanaikaisesti positiivisten cFos-solujen kanssa pystyttiin havaitsemaan vain muutamista aivoista. Reseptorin vaikutusta yliaktiivisen hippokampuksen neuroneiden aktiivisuuteen tutkittiin laskemalla cFos-soluja aivoleikkeistä hippokampuksen alueelta, mutta näistä tuloksista ei löydetty tilastollisesti merkitsevää eroa hiirten eri genotyypin tai lääkehoidon välillä. Tuloksia ei voida yleistää pienen koeryhmän takia ja toistokokeita tarvitaan suuremmalla näytemäärällä. Tutkimuksesta saadut tulokset ovat kuitenkin lupaavia ja tarjoavat uutta tietoa jatkotutkimuksia varten.

Kaiken kaikkiaan insinööriyössä onnistuttiin hyvin ja siinä saavutettiin sille asetetut tavoitteet. Tutkimuksessa saatiin uutta tietoa hippokampuksen neuroneiden toiminnasta ja aktiivisuudesta manian hiirimallilla. Työstä saadut tulokset auttavat lisäämään ymmärrystä aivojen ja neuroneiden toiminnasta kaksisuuntaisen mielialahäiriön maniassa. Tulevaisuudessa on mahdollista löytää ja kehittää lisätutkimusten avulla eri hoitomuotoja ja lopulta toimiva lääkitys kaksisuuntaisen mielialahäiriön aiheuttamaan maniaan.

Lähteet

Bengesser, Susanne & Reininghaus, Eva. 2013. Genetics of Bipolar Disorder. Englanti: Peter Lang AG.

Bullitt, Elizabeth. 1990. Expression of C-fos-Like Protein as a Marker for Neuronal Activity Following Noxious Stimulation in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 296, s. 517–530.

Combs, Christian A. 2010. Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods. *Current Protocols in Neuroscience*. January, s. 1–19.

Dragunow, M. & Faull, R. 1989. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *Journal of Neuroscience Methods*. Vol. 29, s. 261–265.

Fox, James G. & Barthold, Stephen W. & Davisson, Muriel T. & Newcomer, Christian E. & Quimby, Fred W. & Smith, Abigail L. 2007. *The Mouse in Biomedical Research: History, Wild Mice and Genetics*. Lontoo: Academic Press.

Hoffman, Gloria E. & Smith, M. Susan & Verbalis, Joseph G. 1993. c-Fos and Related Immediate Early Gene Products as Markers of Activity in Neuroendocrine Systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Vol. 14, No. 3, s. 173–213.

Iivanainen, Ansa & Jauhiainen, Mari & Syväoja, Pirjo. 2010. *Sairauksien hoitaminen terveyttä edistäen*. Keuruu: Tammi.

Jonas, Peter & Lisman, John. 2014. Structure, function, and plasticity of hippocampal dentate gyrus microcircuits. *Frontiers in neural circuits*. September Vol. 8, Article 107, s. 1–2.

Kaksisuuntainen mielialahäiriö. 2013. Verkkodokumentti. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. <<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/suositus?id=hoi50076>>. Julkaistu 19.03.2013. Luettu 16.1.2017.

Mai, Jürgen K. & Paxinos, George. 2012. *The human nervous system*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

Maksimovic, Milica. 2014. Behavioural and pharmacological characterization of a mouse model for psychotic disorders – focus on glutamateric transmission. Väitöskirja. Helsinki: Hansaprint.

Mental disorders. 2016. Verkkodokumentti. World Health Organization (WHO). <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs396/en>>. Luettu 24.1.2017.

Nolte, John. 2002. *The human brain and introduction to its functional anatomy*, 5th edition. St. Louis: Mosby Inc.

Paxinos, George & Franklin, Keith B. J. 2013. The mouse brain in stereotaxic coordinates, 4th edition. USA: Elsevier Inc.

Pelkonen, Olavi & Ruskoaho, Heikki. 1998. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Vammala: Duodecim.

Procaccini, Chiara & Aitta-aho, Teemu & Jaako-Movits, Külli & Zharkovsky, Alexander & Panhelainen, Anne & Sprengel, Rolf & Linden, Anni-Maija & Korpi, Esa R. 2011. Excessive novelty-induced c-Fos expression and altered neurogenesis in the hippocampus of GluA1 knockout mice. *European Journal of Neuroscience*. Vol. 33, s. 161–174.

Rantala, Immo & Lounatmaa, Kari. 1995. Biologisen elektronimikroskopian menetelmät. Helsinki: Yliopistopaino.

Rantala, Immo & Lounatmaa, Kari. 1998. Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino.

Roth, Bryan L. 2016. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron CellPress*. Vol. 89, s. 683–694.

Sanderson, Michael J. & Smith, Ian & Parker, Ian & Bootman, Martin D. 2014. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. October s. 1–35.

Taylor, Clive R. & Shi, Shang-Rong & Barr, Nancy J. 2011. Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization. s. 1–41. Teoksessa Dabbs, David J. (toim.). 2011. *Diagnostic Immunohistochemistry* 3rd edition. China: Elsevier Inc.

Thorn, Kurt. 2016. A quick guide to light microscopy in cell biology. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 27, s. 219–222.

Traynelis, Stephen F. & Wollmuth, Lonnie P. & McBain, Chris J. & Menniti, Frank S. & Vance, Katie M. & Ogden, Kevin K. & Hansen, Kasper B. & Yuan, Hongjie & Myers, Scott J. & Dingledine, Ray. 2010. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*. Vol. 62, No 3, s. 405–496.

Ullmann, H. F. 2009. *Opas anatomiaan*. München: Elsevier GmbH.

Urban, Daniel J. & Roth, Bryan L. 2015. DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs): Chemogenetic Tools with Therapeutic Utility. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Vol. 55, s. 399–417.

Varela, Carmen & Weiss, Sarah & Meyer, Retsina & Halassa, Michael & Biedenkapp, Joseph & Wilson, Matthew A. & Goosens, Ki Ann & Bendor, Daniel. 2016. Tracking the Time-Dependent Role of the Hippocampus in Memory Recall Using DREADDs. *Plos One*. Vol. 11, s. 1–13.

Vieta, Eduard & Sanchez-Moreno, Jose. 2008. Acute and long-term treatment of mania. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. June 10, s. 165–179.

Watson, Charles & Paxinos, George & Puelles, Luis. 2011. *The mouse nervous system*. China: Elsevier Science.

Webb, Donna J. & Brown, Claire M. 2013. Epi-Fluorescence Microscopy. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 931, s. 29–59.

Wess, Jürgen & Nakajima, Kenichiro & Jain, Shalini. 2013. Novel designer receptors to probe GPCR signaling and physiology. *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol. 32, No 7, s. 385–392.

Whissell, Paul D. & Tohyama, Sarasa & Martin, Loren J. 2016. The Use of DREADDs to Deconstruct Behavior. *Frontiers in Genetics*. Vol. 7, Article 70, s. 1–15.

Zamanillo, Daniel & Sprengel, Rolf & Hvalby, Øivind & Jensen, Vidar & Burnashev, Nail & Rozov Andrei & Kaiser, Katharina M. M. & Köster, Helmut J. & Borchardt, Thilo & Worley, Paul & Lübke, Joachim & Frotscher, Michael & Kelly, Peter H. & Sommer, Bernd & Andersen, Per & Seeburg, Peter H. & Sakmann Bert. 1999. Importance of AMPA Receptors for Hippocampal Synaptic Plasticity But Not for Spatial Learning. *Science*. Vol. 284, s. 1805–1811.

Zhu, Hu & Pleil, Kristen E. & Urban, Daniel J. & Moy, Sheryl S. & Kash, Thomas L. & Roth, Bryan L. 2014. Chemogenetic Inactivation of Ventral Hippocampal Glutamatergic Neurons Disrupts Consolidation of Contextual Fear Memory. *Neuropsychopharmacology*. Vol. 39, s. 1880–1892.

Käytetyt laitteet ja reagenssit

ABC Kit Vectastain (PK-6100)	Vector
Albumin Bovine Serum (US1126575) 10 gm	Merck Life Science Oy
Alumiinifolio	
Avidin/Biotin Blocking Kit (SP-2001)	Vector
Corning CentriStar 15 ml Centrifuge tube (430791)	Corning Incorporated
Cryo Vials sterile 1 ml	Greiner labortechnik
Ethanol absolute AnalaR Normapur 1 l	VWR Chemicals
Ethylene Glycol (BP230-1) 1 l	Fisher BioReagents
FluorSave Reagent (US1245789) 20 ml	Merck Life Science Oy
Glycerol (BP229-1) 1 l	Fisher BioReagents
Hydrogen peroxide 35 % (H ₂ O ₂) (202465000) 500 ml	Acros Organics
Isopropanol Certified AR for analysis (10366430) 1 l	Fisher Scientific
Kuoppalevyt Nunc multidish 6 ja 24	Thermo Scientific
Menzel-Gläser Cover glasses 22x50 mm (12362128)	Thermo Scientific
Menzel-Gläser Superfrost Plus Microscope Slides – 25x75x1,0 mm (J1800AMNZ)	Thermo Scientific
M-1 Embedding Matrix (1310) 180 ml	Thermo Scientific
Parafilm 4 in. 125 ft. (PM-996)	Bemis
Paraformaldehyde 90% pure (169650010) 1 kg	Sigma
Peroxidase Substrate Kit DAB (SK-4100)	Vector
Pipetit	Finnpipette
Pipetin kärjet Optifit Tips	Sartorius
Research Cryostat Leica CM3050 S	Leica
Siveltimet	Tempera Oy
Sodium chloride (NaCl) (BP258-1) 1 kg	Fisher Scientific
Sodium dihydrogen phosphate anhydrous (H ₂ NaO ₄ P) (71496) 1 kg	Sigma-Aldrich
Sodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O) (30413) 1 kg	Riedel-de Haën
Sucrose (S/8600/60) 1 kg	Fisher Scientific
Tissue-Tek (4583) 125 ml	Sakura
Thionin (78338-22-4)	Sigma
Triton X-100 (306324N) 500 ml	BDH

cFos-DAB and mCherry-Fluorescent

FIRST DAY

*wash 3 x 5 min in PBS (make sure 1xPBS when using PBS)

*endoperoxidase quenching with H₂O₂, 1 h in RT

*wash 3 x 5 min in PBS

*blocking 1 h in RT in blocking solution:

3% BSA/10% horse serum/0.3% Triton/in PBS (+ 2 drops of avidin)

*Primary antibody dilution

1:800 goat anti-cFos sc-52G

dilute antibody in blocking solution (prepared above) (+ 2 drops of biotin)

*incubate o/n in +4°C

SECOND DAY – part one (cFos secondary)

*wash 3 x 5min in PBS

*Secondary antibody dilution

1:200 horse biotinylated anti-goat, Vector cat#BA-9500

*incubate 2h in RT (NOTE! protect from light)

(prepare ABC solution (2 microL A + 2 microL B + 500 microL PBS)

let incubate 30 min in dark)

*wash 3 x 5 min in PBS

*incubate ABC solution 1h in RT- protect from light!

*wash 3 x 5 min

*DAB reaction with nickel (in the hood) 5 min

*wash 3 x 5min

SECOND DAY – part two (mCherry primary)

*blocking 1 h in RT in blocking solution:

1% BSA/0.3% Triton/in PBS

*Primary antibody dilution

1:800 rabbit anti-mCherry Abcam *ab167453*

*incubate o/n in +4°C

THIRD DAY – (mCherry secondary)

*wash 3 x 5 min in PBS

*Secondary antibody dilution

1:1000 donkey anti-rabbit 594 Abcam *ab150076*

*incubate 2h in RT (NOTE! protect from light)

*wash 3x5min

*mount on microscopic slides and coverslip

*microscopy!

Virusinjektioiden koordinaatit

Taulukko 2. Kaikkien näytteiden aivoleikkeistä havaitut AP-koordinaatit virusinjektiolle eri puolilla aivoja Bregmaan nähden.

aivot	injektio vasen	injektio oikea
1	-2,03	-2,15
2	-2,15	-1,91
3	-2,06	-2,18
4	-2,15	-2,15
5	-2,18	-2,15
6	-1,91	-1,91
7	-2,15	-2,15
8	-1,91	-1,91
9	-1,91	-1,91
10	-2,15	-1,91
11	-2,15	-2,03
12	-2,03	-1,79
13	-1,91	-1,91
14	-2,03	-1,91
15	-1,91	-2,03
16	-1,67	-1,91
17	-1,91	-1,91
18	-2,03	-2,03
19	-2,27	-2,27
20	-2,03	-2,03
21	-1,67	-2,15

Kaksisuuntainen ANOVA cFos-soluille

Taulukko 3. Kaksisuuntainen ANOVA aivojen dentate gyruksen alueelta lasketuille cFos-soluille.

2way ANOVA Tabular results					
4					
5	Source of Variation	% of total variation	P value		
6	Interaction	19.89	0.0458		
7	wt vs ko	8.14	0.1859		
8	veh vs cno	0.13	0.8639		
9					
10	Source of Variation	P value summary	Significant?		
11	Interaction	*	Yes		
12	wt vs ko	ns	No		
13	veh vs cno	ns	No		
14					
15	Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
16	Interaction	1	1352	1352	4.643
17	wt vs ko	1	553.5	553.5	1.900
18	veh vs cno	1	8.817	8.817	0.03027
19	Residual	17	4952	291.3	
20					
21	Number of missing values	3			
22					
23	Bonferroni posttests				
24					
25	wt vs ko				
26	veh vs cno	wt	ko	Difference	95% CI of diff.
27	veh	16.00	42.40	26.40	-0.1329 to 52.93
28	CNO	30.80	25.00	-5.800	-31.20 to 19.60
29					
30	veh vs cno	Difference	t	P value	Summary
31	veh	26.40	2.446	P > 0.05	ns
32	CNO	-5.800	0.5612	P > 0.05	ns